Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK
R. HARDER-GÖTTINGEN, **O. RENNER**-MÜNCHEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

W. RUHLAND UNTERDEUFSTETTEN — **L. BRAUNER** MÜNCHEN — **E. BÜNNING** TÜBINGEN

51. BAND, 4. HEFT

MIT 79 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 9. MAI 1958)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1958

Planta (Berl.)

Preis DM 29.60

Planta, Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E). Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*.

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotographien u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität, oder an

Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelm-Straße 5.

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 130131

und

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901

---

51. Band **Inhaltsverzeichnis** 4. Heft

Seite

Ullrich, H., und U. Heber, Über das Denaturieren pflanzlicher Eiweiße durch Ausfrieren und seine Verhinderung. Ein Beitrag zur Klärung der Frostresistenz bei Pflanzen. Mit 5 Textabbildungen 399

Schaefer, G., Über Veränderungen des mechanischen und biologischen Kontaktes von Plasma und Zellwand in subplasmolytischen Konzentrationen von Anelektrolyten. Mit 11 Textabbildungen. 414

Bode, H. R., Beiträge zur Kenntnis allelopathischer Erscheinungen bei einigen Juglandaceen. Mit 17 Textabbildungen 440

Guttenberg, H. v., und R. Müller-Schröder, Untersuchungen über die Entwicklung des Embryos und der Keimpflanze von Nuphar luteum Smith. Mit 32 Textabbildungen 481

Zimmermann, W., Wie der Generationswechsel der Archegoniaten und der Phanerogamen entstanden ist. Mit 2 Textabbildungen 511

Pisek, A., und E. Winkler, Assimilationsvermögen und Respiration der Fichte (Picea excelsa Link) in verschiedener Höhenlage und der Zirbe (Pinus cembra L.) an der alpinen Waldgrenze. Mit 12 Textabbildungen. . 518

Kandler, O., Zur Frage einer aeroben Gärung in Wurzelmeristemen. Bemerkung zur Arbeit von A. Betz: Planta 50, 122 (1957). Kurze Mitteilung 544

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta, Bd. 51, S. 399—413 (1958)

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

ÜBER DAS DENATURIEREN PFLANZLICHER EIWEISSE DURCH AUSFRIEREN UND SEINE VERHINDERUNG*

EIN BEITRAG ZUR KLÄRUNG DER FROSTRESISTENZ BEI PFLANZEN

Von

H. Ullrich und U. Heber

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Januar 1958)

Über die Denaturierung von Proteinmolekülen liegt eine umfangreiche Literatur vor, in der es bis jetzt noch nicht gelungen ist, eine einheitliche Vorstellung über die Vorgänge, die zum Denaturieren führen, zu entwickeln. Es erscheint wohl als sicher, daß beim Denaturieren grundsätzliche Strukturveränderungen des Proteinmoleküls stattfinden, ein „Aufbrechen" des Proteinmoleküls oder bei Molekülaggregaten der Proteineinheit. Dieses Aufbrechen, das wahrscheinlich auf eine Lösung interner Wasserstoffbrückenbindungen zurückgeht (zuerst Mirsky und Pauling, 1936), führt zur Änderung einer Vielzahl von Eigenschaften. Es sollen hier nur Änderungen der Löslichkeit, der Viscosität, das Neuauftreten reaktionsfähiger Gruppen und der Verlust physiologischer Aktivität genannt werden.

In einer früheren Veröffentlichung konnte gezeigt werden, daß beim Einfrieren von Eiweißextrakten, die aus Winterweizen-Blättern gewonnen worden waren, eine irreversible Eiweißkoagulation stattfindet (Ullrich und Heber, 1957; s. a. Levitt, 1956). Diese Koagulation geht offenbar zurück auf den beim Einfrieren stattfindenden Wasserentzug. Es zeigte sich, daß die Menge des denaturierten Eiweißes abhängig war vom Zuckergehalt der extrahierten Blätter. Je höher der Zuckergehalt der Blätter lag, desto weniger Eiweiß fiel beim Ausfrieren bei -20^0 C aus. Es erschien nun wünschenswert, diesen Befund näher zu untersuchen, um einmal zu klären, ob nicht andere Stoffe als Zucker, die in der Pflanze möglicherweise zusammen mit Zuckern und dem Zukkergehalt proportional auftreten, für den beobachteten Effekt verantwortlich sein könnten. Die Bedeutung des Zuckergehaltes in der Pflanze für die Frostresistenz wird nämlich gerade in letzter Zeit von verschiedenen Autoren bestritten (u. a. Pisek, 1952). Wenn aber Zucker tatsächlich für den beobachteten Effekt verantwortlich sein sollten, so

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. Ruhland in Dankbarkeit und Verehrung zum 80. Geburtstag gewidmet.

war zu prüfen, ob sich diese Schutzwirkung nur auf bestimmte Saccharide erstreckt, und welches wirksame Prinzip dieser Schutzwirkung zugrunde liegt. Der gangbarste Weg zur experimentellen Lösung der Frage schien es zu sein, aus Blattextrakten die niedermolekularen Bestandteile durch Dialyse zu entfernen und dann die Wirkung von Zusätzen definierter Stoffe auf die resultierende Plasmaeiweißlösung zu prüfen.

Material und Methode

a) Extraktion. Die Extraktion der Eiweiße wurde an Weizenpflanzen der Sorte „Hauter's II" vorgenommen. Die Pflanzen wurden im Spätherbst 1956 im Freiland ausgesät. Die Blatternten von jeweils etwa 120 bis 200 g Frischmaterial erfolgten in den Monaten März und April 1957, also vor und bei Beginn des Schossens. Direkt anschließend an die Ernte wurden die Blätter mit der Schere zerkleinert und danach mit einem „Atommixmill"-Gerät (Werkstatt für Apparatebau, Mühlheim/Baden) homogenisiert. Mit der zunehmenden Ausbildung sklerenchymatischer Elemente wurde es nötig, zwischen Vorzerkleinerung und Feinhomogenisierung eine Zwischenzerkleinerung im Starmix einzuschalten, alles unter Eiskühlung. Der P_H-Wert des Homogenisates wurde durch sukzessive Alkalizugaben etwa zwischen p_H 7,5 und 8,5 gehalten, was notwendig ist, um Fällungen der Eiweiße durch den sauren Vacuoleninhalt zu verhindern. Durch die guten Pufferungseigenschaften der aus den Zellen herausgelösten Proteine ist es bei einiger Übung leicht möglich, innerhalb des oben angegebenen p_H-Bereiches zu arbeiten. Das Homogenisat wurde 12 Minuten bei 1400 g auszentrifugiert. Dabei trennen sich seine Komponenten und verteilen sich auf drei Zonen: Die oberste besteht aus faserigen Leitbündelelementen, die abgehoben werden. Die mittlere Zone ist eine dunkelgrüne Proteinlösung, während das Sediment aus Zellwandsubstanzen und geringen Mengen von denaturiertem Eiweiß besteht. Die Proteinlösung wurde durch Glaswolle gegossen, wobei Faserbestandteile und Zellwandpartikel über der Glaswolle ausgewaschen wurden. Das grüne Filtrat, das starken Tyndalleffekt zeigte, wurde durch Vakuumdestillation bei 37° C je nach der Menge des Frischgewichtes der Blätter auf etwa 100—180 cm^3 eingeengt und die verbleibende Flüssigkeit 10 Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Das hauptsächlich aus denaturierten grüngefärbten Proteiden bestehende Sediment wurde verworfen. Die dunkelgrüne überstehende Lösung wurde in Cellophanschläuchen (Fa. Kalle & Co) 60 Stunden bei 2° C gegen Phosphatpuffer von p_H 7,1 dialysiert. Der Puffer wurde in der Dialysezeit mehrmals gewechselt. Anschließend wurde bei 1400 g 10 Minuten zentrifugiert. Geringe Mengen an grünen Sedimenten wurden verworfen. In der Lösung führten wir elektrophoretische Proteinbestimmungen mit der Antweilerschen Mikroelektrophoreseapparatur

durch, die gleichzeitig eine Kontrolle auf nicht dialysierte, im elektrischen Feld nicht wandernde Substanzen (z. B. Zucker) darstellten. Die Kontrolle zeigte immer ein negatives Resultat. Die Proteingehalte der Lösungen schwankten zwischen 3 und 4,5%. Sämtliche Proteine wanderten in einer Front. Sie ergab elektrophoretisch nach ANTWEILER ausgewertet einen einzigen Gipfel, doch ließen sich Unterfraktionen abgrenzen. Durch Zugabe von Phosphatpuffer vom p_H 7,1 wurde die Eiweißlösung für die eigentlichen Frostschutzversuche auf einen Proteingehalt von genau 2,7% eingestellt.

b) Frostschutzversuche. Verschiedene Mengen der zu prüfenden Substanzen wurden in Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit Phosphatpuffer auf 1,5 g Gesamtgewicht Substanz + Phosphatpuffer aufgefüllt und anschließend durch Erwärmen in Lösung gebracht. Nun wurden in die Zentrifugenröhrchen 4,5 ml der 2,7%igen Eiweißlösung eingefüllt und durch Kippen bei verschlossenem Röhrchen vermischt. Anschließend wurde im Kühlschrank bei —20° eingefroren, nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufgetaut, abermals durch Kippen der Röhrchen gemischt und dann bei 1200 g 15 Minuten auszentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit läßt sich bei entsprechender Vorsicht weitgehend quantitativ dekantieren. Die Röhrchen mit dem Sediment wurden dann 24 Stunden im Vakuum bei 35° C über Silikagel getrocknet. Anschließend wurde mit kaltem, schwach alkalischem Wasser einige Stunden unter gelegentlichem Aufrühren extrahiert, wieder 15 Minuten bei 1200 g zentrifugiert und das Überstehende dekantiert. Dies geschah, um bei der ersten Sedimentation mit zu Boden gerissene oder inkludierte, nicht irreversibel koagulierte Proteinteile zu entfernen. Das Sediment wurde nun noch einmal mit heißem Wasser extrahiert, um möglicherweise bei der ersten Extraktion nicht herausgelöste niedermolekulare Bestandteile aus dem Sediment zu entfernen. Nach nochmaligem Zentrifugieren und Dekantieren gelangten Sediment und Zentrifugenröhrchen nun im Vakuum (unter 1 mm Hg) bei 50° C 24 Stunden über Silikagel zur Trocknung und anschließend zur Wägung. Aus der Menge des Sedimentes dividiert durch den elektrophoretisch bestimmten Gesamtproteingehalt der Lösung ergab sich der Anteil an denaturiertem Protein.

Ergänzend zu den methodischen Ausführungen ist noch zu bemerken, daß es nicht gelang, die Eiweißextraktion in absolut reproduzierbarer Weise durchzuführen. Parallelextraktionen desselben Materials führten zwar zu weitgehend reproduzierbaren Werten, doch differierten bei an verschiedenen Tagen gewonnenen Eiweißlösungen, die die gleiche Zuckerkonzentration enthielten, die prozentualen Anteile an denaturiertem Protein z. T. recht stark, obgleich das relative Verhältnis der Schutzwirkung verschiedener Zucker zueinander gleich blieb. Es läßt sich noch nicht sagen, ob diese verschiedene Empfindlichkeit der Eiweiße auf nicht

absolut konstant gehaltene Extraktionsbedingungen oder aber möglicherweise auf einen unterschiedlichen Zustand ein und derselben Eiweiße in der Zelle zu verschiedenen Zeiten zurückzuführen ist.

Die Wirksamkeit verschiedener Schutzstoffe im Vergleich zueinander blieb, wie gesagt wurde, bei verschiedenen Frostschutzansätzen gleich. Daher schien es erlaubt, in wenigen Fällen (s. Abb. 4 u. 5), die Frostschutzkurve eines Stoffes von einem auf einen anderen Ansatz umzurechnen, weil es uns arbeitstechnisch unmöglich war, gleichzeitig viele parallele Versuche durchzuführen. Dazu wurden dann bei jedem Ansatz zwei „Eichkurven" der Frostschutzwirkung von Saccharose und Fructose mitgeführt. Der Rechenvorgang sei an Hand eines Beispiels aufgezeigt: Die Ribose-Schutzkurve soll von Ansatz a auf Ansatz b umgerechnet werden. Es werden die Prozentzahlen an denaturiertem Protein bei verschiedenen Saccharosekonzentrationen von Ansatz a durch die entsprechenden Prozentzahlen von Ansatz b bei gleichen Saccharosekonzentrationen geteilt. Mit den erhaltenen Zahlenwerten werden bei den gleichen Zuckerkonzentrationen die dem Riboseschutz entsprechenden Prozentzahlen an denaturiertem Protein von Ansatz a multipliziert. Das gleiche wurde zur Kontrolle mit der Fructosekurve von Ansatz a durchgeführt. Die erhaltenen Werte werden in das Diagramm von Ansatz b eingezeichnet und untereinander verbunden. Die errechnete Fructosekurve stimmte stets befriedigend mit der gefundenen überein, woraus geschlossen wird, daß dasselbe mit der errechneten Ribosekurve der Fall sein dürfte.

c) Kritik der Frostschutzversuche. Die oben angegebene Frostschutzbestimmung ist nun in zweifacher Beziehung kritisch zu erörtern. Es erscheint der Einwand möglich, daß es nicht statthaft ist, den ausgefallenen Proteinanteil als denaturiert zu bezeichnen. Anson (1944) zeigte aber, daß der abweichend von normalen chemischen Reaktionen außerordentlich hohe Temperaturkoeffizient der Denaturierung etwa derselbe ist wie der der Aggregation in der Nähe des isoelektrischen Punktes. Das würde wohl bedeuten, daß die Aggregation nur eine Folgereaktion der Denaturierung darstellt, gleichgültig, ob dieselbe nun durch Hitze oder durch Wasserentzug beim Einfrieren vorgenommen wird. Wahrscheinlich ist die Erhöhung der Reaktivität, die zur Aggregation führt, dem Aufbrechen von Bindungen zwischen Polypeptidketten, d. h. der Denaturierung, korreliert. Außerdem zeigt es sich, daß die beim Einfrieren stattfindende Proteinfällung nicht reversibel ist. Das Koagulat löst sich weder in verdünnter Säure noch in schwachem Alkali und zeigt damit alle Anzeichen einer Vernetzung.

Wenn also nach einem Eingriff unter sonst gleichen Bedingungen einmal eine irreversible Proteinfällung erfolgt, während auf der anderen Seite nach Zusatz eines Schutzstoffes die Lösung in Bezug auf ihr Aussehen und ihr Zentrifugierungsverhalten unverändert bleibt, so ist der sichere Schluß zu ziehen, daß im ersten Falle eine Proteindenaturierung erfolgt ist. Damit ist noch nicht unbedingt gesagt, daß in der nach Aussehen und Zentrifugierungsverhalten unveränderten Lösung keine Denaturierung stattgefunden hat, da ja die Denaturierung nicht unbedingt von einer Fällung begleitet sein muß. Es sprechen jedoch wesentliche

Gründe dafür, anzunehmen, daß diese Proteinlösung den Einfriervorgang im wesentlichen unverändert überstanden hat. Bei p_H 7,1 wäre bei einer Denaturierung der Plasmaproteine eine Aggregation zu erwarten, da die fraglichen nativen Eiweiße schon in vivo und auch in vitro bei p_H-Werten von und unter 6,5 ausfallen. Nun ist ja allgemein ein denaturiertes Protein unlöslicher, d. h. hydrophober als das entsprechende native Protein (FERRY, 1948) und bei einem so wenig von der Fällungsgrenze entfernten p_H-Wert wäre im Denaturierungsfalle eine Aggregation zu erwarten.

Weiter wurde bei denaturiertem Protein gefunden, daß sich die elektrophoretische Beweglichkeit gegenüber dem nativen Protein veränderte (PUTNAM, 1953). Vor und nach dem Gefrieren konnte aber kein Unterschied im elektrophoretischen Verhalten von Zucker-stabilisierten Plasmaeiweißlösungen gefunden werden. Die Proteine der Mischung einer gefrorenen und einer ungefrorenen Lösung wanderten in *einem* „Gipfel". Da sich dabei möglicherweise beide Proteine beeinflussen konnten, wurden auch die Wanderungsgeschwindigkeiten bei der getrennten Elektrophorese beider Lösungen verglichen. Selbst da konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Schließlich konnten PORTER und Mitarbeiter (1953) in einer interessanten Arbeit zeigen, daß beim Einfrieren von Zellpartikeln aus Rattenleber die Fähigkeit zur Substratoxydation zum größten Teil verloren ging, bei Zusatz von Rohrzucker zur Suspension aber weitgehend erhalten blieb. Rohrzucker stabilisierte also — wie die Autoren meinen, in mechanischer Weise — die physiologische Aktivität der Zellpartikel. Es besteht kein Grund, anzunehmen, daß die Verhältnisse beim Einfrieren pflanzlicher Eiweißlösungen, die von größeren Partikeln befreit wurden (Zentrifugieren bei 4000 g), anders liegen.

Aber selbst wenn in der gefrorenen, aber durch Zusatz von Schutzstoffen stabilisierten Proteinlösung eine geringfügige Änderung physikalischer Eigenschaften stattgefunden haben sollte, wären solche Änderungen hier im Sinne der vorgenommenen Untersuchung nicht als Denaturierung zu betrachten, da sie die Proteinmoleküle oder die Proteineinheiten nicht derart labilisieren, daß sie mit Nachbarmolekülen oder -einheiten aggregieren und schließlich ausflocken. Bei Molekülen oder Molekülaggregaten derartiger struktureller Komplexität, wie dies bei Proteinen der Fall ist, dürfte der experimentelle Eingriff, wie er bei der Extraktion aus dem Plasmagefüge oder vielleicht auch beim Einfrieren — wenn auch in Gegenwart von Schutzstoffen — vorgenommen wird, sowieso zu allerdings geringfügigen und für unsere relativ groben Meßmethoden nicht faßbaren Veränderungen Anlaß geben (z. B. Aufbrechen von wenigen „unwichtigen" Wasserstoffbrückenbindungen; vgl. auch STEARNS 1949).

Ergebnisse und deren Diskussion

Aus der Vermutung heraus, daß Zucker das schützende Agens bei der Frostdenaturierung der Plasmaeiweiße darstellen — eine

Vermutung, die an anderer Stelle näher begründet wurde (Ullrich und Heber 1957) —, wurden nach der Dialyse und der damit verbundenen Entfernung der niedermolekularen Bestandteile zu den Eiweißlösungen verschiedene Zucker in wechselnden Mengenverhältnissen zugesetzt. Das Ergebnis eines Zuckerschutzversuches zeigt Abb. 1. Auf der Ordinate ist der prozentuale Anteil des frostkoagulierten Proteins vom Gesamteiweiß aufgetragen, während die Abszisse den Zuckergehalt der Lösung in Gewichtsprozenten angibt. Es zeigt sich tatsächlich eine ausgeprägte Schutzwirkung der Zucker. Bis zu einer Monosaccharidkonzentration von ungefähr drei Prozent ist die Schutzwirkung des Zuckers etwa linear proportional der Zucker-Konzentration. Dann nimmt die Kurve einen asymptotischen Verlauf. Ohne Zusatz von Zuckern wurden über 50% der Proteine denaturiert.

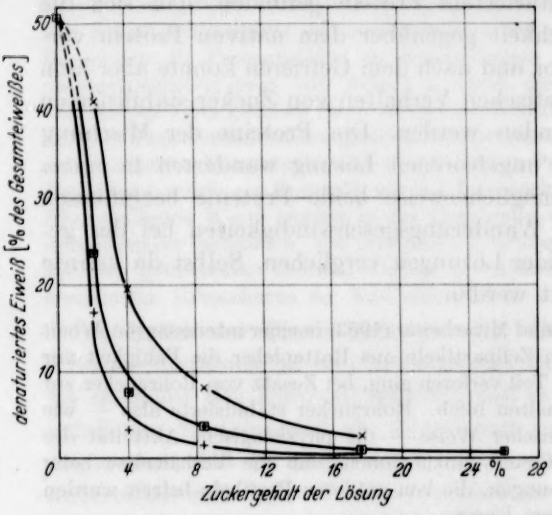


Abb. 1. Schutzwirkung verschieden großer Zucker auf 2%ige Eiweißlösungen aus Weizenblättern. Gefrierzeit der Lösungen 24 Stunden. Ordinate: Menge an denaturiertem Protein bezogen auf das Gesamtprotein. Abszisse: Schutzstoffgehalt in Gewichtsprozent der Lösung. ⊡ Saccharose, × Raffinose, + Fructose

Man muß sich nun fragen, ob stets ein gewisser Anteil von *allen* vorhandenen Plasmaproteinen durch das Gefrieren aggregiert wurde oder ob nur ganz *bestimmte* Proteine gefällt wurden. Wie sich aus Zentrifugierversuchen bei 20000 g ergab, sind die bei dieser Zentrifugalbeschleunigung nach einer Stunde in Lösung verbleibenden Proteine nicht oder nur in sehr geringem Ausmaße frostempfindlich, so daß die frostlabilen Proteine im Rückstand zu suchen sind. Der Rückstand enthält über 20% Lipoide, wie aus Alkoholextraktionen hervorging. Daß Lipoproteide besonders empfindlich gegen Wasserentzug sind, schlossen bereits Oncley und Mitarbeiter (1950) aus dem Verhalten des β-Lipoproteids von menschlichem Serum. Aus dem Zentrifugalverhalten der labilen Proteine geht weiter hervor, daß es sich um Teilchen von außerordentlich hohem Molekulargewicht oder Teilchengewicht handeln muß.

Es sind verschiedene Mechanismen einer Zuckerschutzwirkung denkbar:

a) Die einfachste Erklärung ist wohl die, daß Zucker über die Gefrierpunktserniedrigung eine Frostdenaturierung von Eiweißen

verhindern. Diese Vermutung wurde bisher wiederholt geäußert, um den öfters beobachteten Parallelismus zwischen der Frostresistenz von Pflanzen und ihrem Zuckergehalt zu erklären. Die Gefrierpunktserniedrigung ist aber sehr gering (z. B. für eine 34%ige Rohrzuckerlösung 1,8° C). Selbst wenn man berücksichtigt, daß mit dem Ausfrieren reinen Wassers die Zuckerkonzentration der verbleibenden Lösung ansteigt und damit der Gefrierpunkt weiter sinkt (s. ÅKERMANN 1927, LEVITT 1957 u. a.), reicht die mögliche Gefrierpunktserniedrigung nicht aus, um einen Schutzeffekt zu erzielen. Der eutektische Punkt einer Glucoselösung liegt z. B. bei —5° C. Bei dieser Temperatur erstarrt die gesamte Lösung, wenn auch die Zucker infolge ihres schlechten Kristallisationsvermögens noch zwischen den einzelnen Eiskristallen hydratisiert verteilt sein mögen und nicht sofort auskristallisieren. Der Zuckergehalt in der Weizenpflanze beträgt auch in der Zeit hoher Frostresistenz, also beim höchsten Zuckerspiegel, nicht über 10% des Frischgewichtes der Pflanze, was unter Berücksichtigung des Vorkommens an Monosacchariden und Oligosacchariden einer Gefrierpunktserniedrigung von etwa einem Grad Celsius entsprechen mag.

b) Andererseits kommt in Betracht, daß die Zucker über ihre Wasserbindung wirken. Soeben wurde schon betont, daß die Zucker auch unter dem eutektischen Punkt noch nicht sofort auskristallisieren müssen, daß sie vielmehr zwischen den einzelnen Eiskristallen hydratisiert vorliegen können. Es erscheint nun möglich, daß der an die Zucker lockerer und ± beweglich gebundene Wasseranteil auch den Eiweißen zur Verfügung steht, so daß eine Denaturierung derselben durch Wasserentzug unterbleibt. Wenn diese Vorstellung auf richtigen Voraussetzungen beruht, müßte die Schutzwirkung der Zucker streng zeitabhängig sein. Wenn nämlich Zucker auch unterhalb des eutektischen Punktes noch hydratisiert, sozusagen „in Lösung", vorliegen können, so werden sie doch langsam auskristallisieren, wobei die Kristallisationsgeschwindigkeit von der Keimbildungswahrscheinlichkeit und dem Viscositätsgrad der Lösung abhängt. In dem Maße, wie der Zucker schließlich doch auskristallisiert, geht auch der ursprünglich an Zucker gebundene Wasseranteil, und zwar das lockerer gebundene Wasser und ein bestimmter Teil des fest gebundenen Wassers, in den Gitterverband der Eiskristalle ein, während ein anderer Teil je nach der Natur des Zuckers zusammen mit diesem auskristallisiert (z. B. bei Glucose ein Mol Wasser auf ein Mol Zucker)[1]. Zumindest in diesem Stadium müßte also eine

[1] Als „fest gebundenes Wasser" soll hier immer der Hydratanteil bezeichnet werden, der mit einem größeren Energiebetrag als etwa 1,4 kcal/Mol über dem Energieniveau des Wassers, also der Energiemenge, die beim Gefrieren von einem Mol Wasser frei wird, an den Zucker gebunden und also nicht ausfrierbar ist, sofern der Zucker nicht selbst zur Kristallisation kommt.

Dehydratisierung der zwischen den einzelnen Zucker- und Eiweißkristallen verteilten Eiweißmoleküle stattfinden, die zu deren Denaturierung führt. Es müßte also die Menge des denaturierten Eiweißes abhängig sein von der Gefrierzeit.

Eine solche Abhängigkeit wurde tatsächlich in gewissem Ausmaße gefunden, wie Abb. 2 zeigt. Es wurden 2%ige Eiweißlösungen mit wechselnden Mengen Glucose bei —20° C eingefroren und nach 24 Stunden, nach 5 und nach 8 Wochen aufgetaut. Die Menge des denaturierten Eiweißes ist nach kurzzeitigem Einfrieren deutlich geringer als nach fünfwöchigem Einwirken gleicher niedriger Temperaturen. Beim Auftauen nach 8 Wochen hatte sich die Menge des denaturierten Proteins gegenüber dem fünfwöchigen Frosten nicht oder nicht wesentlich geändert.

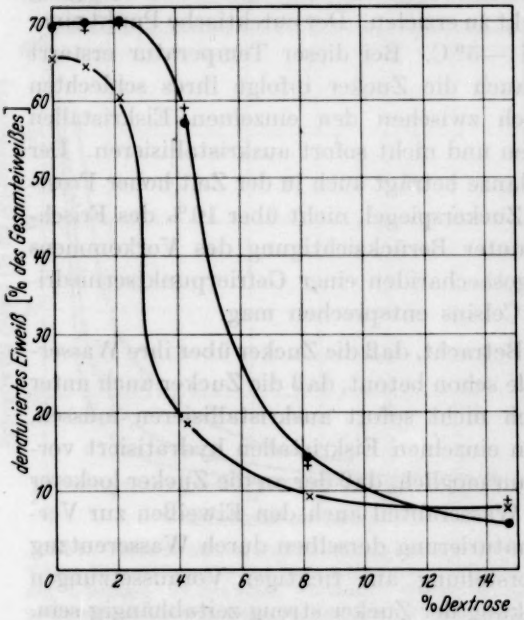


Abb. 2. Schutzwirkung von Dextrose auf 2%ige Eiweißlösungen aus Weizenblättern bei verschiedenen Gefrierzeiten. Darstellung wie in Abb. 1. × 24 Stunden Gefrierzeit, ● 5 Wochen Gefrierzeit, + 8 Wochen Gefrierzeit

Aus diesem Versuch geht hervor, daß tatsächlich von Zuckern locker gebundenes Wasser an der Stabilisierung der Proteine bei kurzzeitigem Einfrieren beteiligt sein mag. Bei der langsamen Kristallisation des auch nach dem Einfrieren stark hydratisiert vorliegenden Zuckers wird dieses Wasser freigegeben, um in den Kristallverband des Eises eingebaut zu werden. Das durch diesen Wasseranteil vorher stabilisierte Protein denaturiert. Daraus, daß die Menge des denaturierten Proteins sich bei der gewählten Temperatur beim 8-Wochen-Versuch gegenüber dem 5-Wochen-Versuch nicht wesentlich änderte, dürfte zu schließen sein, daß etwa nach 5 Wochen die Kristallisation der Zucker praktisch abgeschlossen war (d. h. daß aller Zucker, der für eine Kristallisation verfügbar war, auch auskristallisiert ist). Das geht auch aus anderen Untersuchungen hervor: Je eine 4%ige Glucoselösung in Phosphatpuffer und in gepufferter Eiweißlösung wurden auf —20° C eingefroren. Nach einer Woche wurden die gefrorenen Lösungen bei ebenfalls —20° C

gefriergetrocknet und mikroskopisch auf Kristalle untersucht. Das gefriergetrocknete Material aus Phosphatpuffer erwies sich nach Zerstoßen als schönes mikrokristallines Pulver. Das Material aus der Glucose-Eiweißlösung zeigte — wahrscheinlich infolge des vom Eiweiß bei der Trocknung verursachten Verklebens — keine so deutliche kristalline Struktur, doch war auch hier unverkennbar, daß Kristallisation wenigstens des größten Teils des Zuckers stattgefunden hatte.

Wenn nach Abschluß der Kristallisationsvorgänge der Zucker also noch eine Frostschutzwirkung festgestellt wird, wie aus Abb. 2 ersichtlich ist, so kann geschlossen werden, daß ein in lockerer Weise gebundener, nur langsam auskristallisierbarer Wasseranteil der Zucker zumindest nicht die alleinige Ursache ihrer Schutzwirkung ist.

Es gibt aber noch ein anderes Kriterium dafür, daß die Eiweiße im Wesentlichen nicht nur sekundär über mehr oder weniger locker an den Zuckern festgehaltene Wasseranteile stabilisiert werden. Wenn das nämlich der Fall wäre, müßte die Schutzwirkung verschiedener Zucker etwa proportional sein der Löslichkeit dieser Zucker in Wasser, da ja deren Löslichkeit ein annäherndes Maß für ihre Hydratationsfähigkeit ist. Auch eine solche Proportionalität ist nicht zu beobachten (vgl. Tab. 1).

Tabelle 1. *Vergleich der Schutzwirkung verschiedener Zucker mit ihrer Wasserlöslichkeit*

Zuckerart	Löslichkeit in 100 cm^3 Wasser von 18° C (nach D'Ans-Lax u. Landoldt-Börnstein, z. T. interpoliert) g	Durch Schutzstoff stabilisiertes Protein in % des frostempfindlichen Proteins (i. e. des Proteins, das beim Gefrieren ohne Schutzstoffzusatz denaturiert). Proteingehalt der Lösung 2 %, Saccharidgehalt 4 % %
Arabinose	75	86,3
Glucose	150	86,7
Fructose	340	89,0
meso-Inosit . . .	20	52,6
Mannit	15,6	5,1
Saccharose . . .	198	78,5
Raffinose	18	62,8
Kontrolle, ohne Zuckerzusatz gesetzt		= 100,0

Die bisher geschilderten Möglichkeiten einer Zuckerschutzwirkung waren indirekter Natur. Es erscheint jedoch möglich, daß die Zucker auf direktem Wege die Frostdenaturierung zu hindern imstande sind. Das kann etwa über die Bildung von stabilen und evtl. gegen Wasserentzug resistenten Glykoproteiden — Zucker-Proteinverbindungen — wie das JEREMIAS (1956) vermutete, geschehen oder aber auf Grund

ihrer physikalischen Eigenschaften, die denen des Wassers ähnlich sind und den Zuckern einen Ersatz des ausgefrorenen Wassers gestatten könnten.

Die Prüfung der ersten Ansicht ergab, daß eine Bildung von stabilen Protein-Zucker-Verbindungen nicht stattfindet. Dies konnte z.B. dadurch gezeigt werden, daß eine beim Gefrieren durch 5% Dextrosezusatz stabilisierte 2%ige Proteinlösung nach 48stündiger Dialyse gegen Phosphatpuffer, durch die der Zucker entfernt wurde, und anschließend wiederholtem Gefrieren eine starke Proteinfällung ergab, die nur sehr wenig unter der Fällung einer Kontrollösung ohne Zuckerzusatz lag (50,3% denaturiertes Protein gegenüber 52,4% bei der Kontrolle).

Als Arbeitshypothese bildeten wir uns nun folgende Vorstellung vom Mechanismus der Denaturierung frostempfindlicher Eiweiße: Beim Einfrieren werden polare Gruppen des Proteinmoleküls oder der Proteineinheit dehydratisiert, da erst freies, dann auch gebundenes Wasser in das Kristallgitter des Eises eingebaut wird. Die im normalen Lösungszustande hydratisierten polaren Gruppen werden ihrer Ausdehnung nach reduziert, demaskiert und können so von einem bestimmten energetischen Zustand an miteinander reagieren. Diese Vorstellung soll an Hand eines Beispiels verdeutlicht werden. Es soll je eine positiv und eine negativ geladene Gruppe zweier benachbarter Proteinmoleküle oder Proteineinheiten betrachtet werden. Diese Gruppen sind in wäßriger Lösung entsprechend ihrem polaren Charakter mehr oder weniger hydratisiert, wobei ihr benachbarte Wassermoleküle relativ fest (größenordnungsmäßig mit 1 bis 3 kcal/Mol über dem Energieniveau des Wassers, wie sich aus den Hydratationsenergien verschiedener Verbindungen ergibt, oder höher, vgl. Huggins, 1936; Butler, 1937; Dole, M., McLaren, 1947; Pauling, 1948; Naggis und Mitarbeiter 1952), die entfernteren lockerer gebunden sind. Die Festigkeit der Wasserstoffbrücken und Ionen-Dipolbindungen dürfte bei den einzelnen Eiweißen verschieden sein und hängt wahrscheinlich vom gesamten energetischen Zustand des in Frage kommenden Eiweißmoleküls ab, wahrscheinlich auch davon, inwieweit die Hydratationsfähigkeit der polaren Gruppen durch prosthetische Gruppen der Eiweiße (Lipoide) „belastet" ist. Die Energie, die bei einer Annäherung der beiden, mit je einer Elementarladung verschiedenen Vorzeichens gedachten Gruppen frei wird, errechnet sich näherungsweise aus dem Coulombschen Gesetz unter Berücksichtigung der hohen Dielektrizitätskonstante des Wassers. Bei 10 Å Abstand der beiden Gruppen würden etwa 0,4 kcal/Mol frei werden, bei 4 Å etwa eine kcal und bei 2 Å zwei kcal. Bei 2,5 Å liegt aber etwa die Dicke einer einmolekularen Hydratschicht. Bei dieser nur größenordnungsmäßigen Berechnung ist es allerdings sehr fraglich, ob tatsächlich im betrachteten Bereich die Dielektrizitätskonstante des Wassers eingesetzt werden darf (vgl. Buchanan und Mitarbeiter 1952) und nicht

vielmehr ein weit niedrigerer Wert erforderlich ist, der zu entsprechend größeren Energieabgaben führen müßte. Überhaupt herrschen auch über die energetischen Verhältnisse beispielsweise bei der Bindung von Carboxyl- und Aminogruppen beträchtliche Meinungsverschiedenheiten (PUTNAM 1953, S. 885). Es kommt hier jedoch weniger auf die Richtigkeit der verwendeten Daten, für die gesicherte Angaben nicht zur Verfügung stehen, als auf die Verdeutlichung der Vorstellung vom Wirkungsmechanismus an. Wird nun durch den Einfriervorgang die Dicke der gesamten Hydratschicht reduziert und kommen sich die beiden Gruppen so nahe, daß ihre Wechselwirkungsenergie die Hydratationsenthalpie bzw. Wasserstoffbrückenbindungsenergie überschreitet, so kommt es zu Vernetzungsreaktionen und das Protein denaturiert unter Aggregation. Sind aber Zucker in der Lösung, so vermögen die polaren und über ihre OH-Gruppen auch zu Wasserstoffbrückenbindungen befähigten Zuckermoleküle die in den Kristallverband des Eises einbezogenen Wassermoleküle der Hydrathülle weitgehend zu ersetzen. Es ist dabei im Grunde gleichgültig, ob nun eine Schutzfunktion von den OH-Gruppen der Zucker selbst ausgeht oder ob fest an die Zucker gebundene Wassermoleküle an der Schutzfunktion beteiligt sind, wobei das Wasser also gewissermaßen den Pfeiler einer Brücke darstellt. In beiden Fällen wirkt jedes Zuckermolekül als eine Einheit.

Durch das Einschalten der Zucker kommt es nicht zu einer derartigen Annäherung der polaren reaktiven Gruppen, bei der eine Vernetzungsreaktion eintreten könnte, und das Protein bleibt auch nach dem Einfrieren im gleichen Zustand wie in wäßriger Lösung.

Bei dieser Betrachtung mag es sogar letztlich gleichgültig sein, ob eine Denaturierung auf die beobachtete Vernetzungsreaktion folgt, oder ob die Denaturierung dadurch verursacht wird, daß das Protein durch den Wasserentzug beim Gefrieren und das dabei erfolgende Lösen von Dipolbindungen auf ein höheres energetisches Niveau gehoben wird, von dem aus es denaturiert, wobei dann eine Vernetzung eben als Folge der höheren Reaktionsfähigkeit des denaturierten Proteins eintreten kann.

Im Zusammenhang mit der entwickelten Hypothese ist es interessant, daß zum Zustandekommen einer Schutzwirkung eine gewisse Grenzkonzentration an Zucker erforderlich ist, wie aus Abb. 2 zu erschließen ist. (In den anderen Abbildungen ist das nicht so klar ersichtlich; bei dem in Abb. 2 dargestellten Versuch wurde im Gegensatz zu den anderen Versuchen relativ altes Blattmaterial aufgearbeitet, das von bereits im Schossen befindlichen Weizenpflanzen stammte und offenbar empfindlicheres Protein enthielt.) Das heißt also, daß die zu schützenden Proteinteilchen mit einer gewissen Menge Zucker in Wechselwirkung treten müssen, ehe überhaupt eine Schutzwirkung zustande kommt. Dieser Befund stimmt gut überein mit der postulierten Annahme von polaren reaktionsfähigen Gruppen. BOYER und Mitarbeiter (1946) fanden, daß

Rinderserumalbumin bei Zugabe von langkettigen Fettsäuren und anderen Substanzen gegen Hitzekoagulation und Viscositätsanstieg beim Erhitzen geschützt wird, wobei zu einer guten Schutzwirkung die Aufnahme definierter Mengen an Schutzstoff pro Molekül Protein erforderlich ist. Auch dies dürfte auf die Existenz von Empfindlichkeitszentren im Proteinmolekül hinweisen (vgl. Putnam 1948).

Gilt die oben erörterte Arbeitshypothese, so ist zu fordern, daß die Schutzwirkung der Zucker auf Grund eines molekularen Mechanismus erfolgt. Es kommt dann weder auf die unterschiedliche

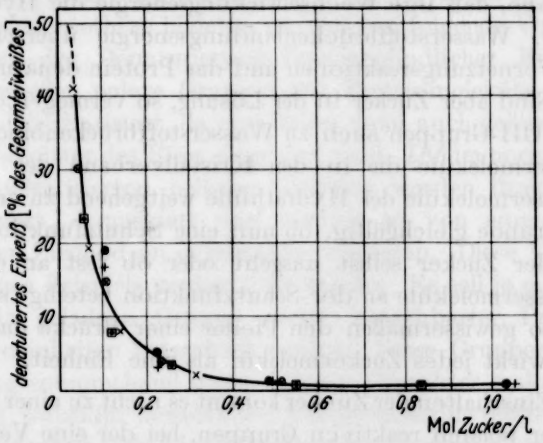


Abb. 3. Molare Schutzwirkung verschiedener Zucker auf 2%ige Eiweißlösungen aus Weizenblättern. Gefrierzeit der Lösungen 24 Stunden. Ordinate: Menge an denaturiertem Protein, bezogen auf das Gesamtprotein. Abszisse: Konzentration der Schutzstoffe in Mol/l. × Raffinose, ● Glukose, + Fructose, ⊡ Saccharose, ⊗ Arabinose

Löslichkeit noch auf die Größe der Zucker an, sondern nur darauf, ob die Zucker einen Platz in der Hydrathülle einnehmen oder nicht, also auf die Anzahl der Zuckerteilchen. Um dies zu klären, wurden vergleichend auf molarer Basis Zucker verschiedener Größe auf ihre Schutzwirksamkeit geprüft. Dabei ergab es sich, daß der Kurvenverlauf eines Trisaccharides (Raffinose) tatsächlich ungefähr dem eines Disaccharides (Saccharose) oder eines Monosaccharides (Glucose, Arabinose) innerhalb der Fehlergrenzen der Methode entsprach (Abb. 3). (Verschiedene Monosaccharide, z. B. Glucose, Fructose, Sorbose, Galaktose, zeigten jeweils gleichen Kurvenverlauf).

Abweichungen ergaben sich jedoch bei der Prüfung auch anderer hydroxylhaltiger Körper, die alle eine Schutzfunktion ausüben können. Abb. 4 zeigt die Schutzwirkung von Methanol, Äthylenglykol, Glycerin, Mannit und Inosit im Vergleich zu Saccharose. Auf der Abszisse sind pie Molaritäten der OH-Gruppen tragenden Stoffe aufgetragen, auf der Ordinate der Prozentsatz an denaturiertem Protein. Abb. 5 zeigt das

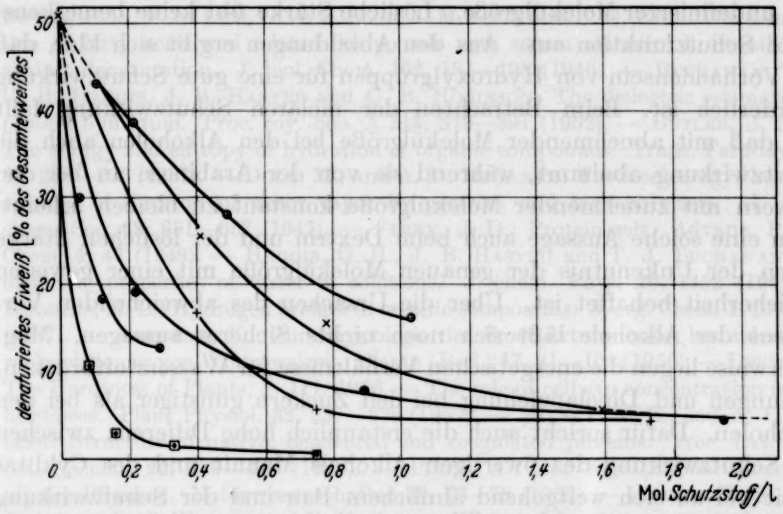


Abb. 4. Molare Schutzwirkung verschiedener hydroxylhaltiger Stoffe auf 2 %ige Eiweißlösungen aus Weizenblättern. Gefrierzeit der Lösungen 24 Stunden. Darstellung wie in Abb. 2. × Methanol, + Äthylenglykol, ⊗ Mesoinosit, ● Glycerin (umgerechnet), ⊕ Mannit (umgerechnet), ⊡ Saccharose

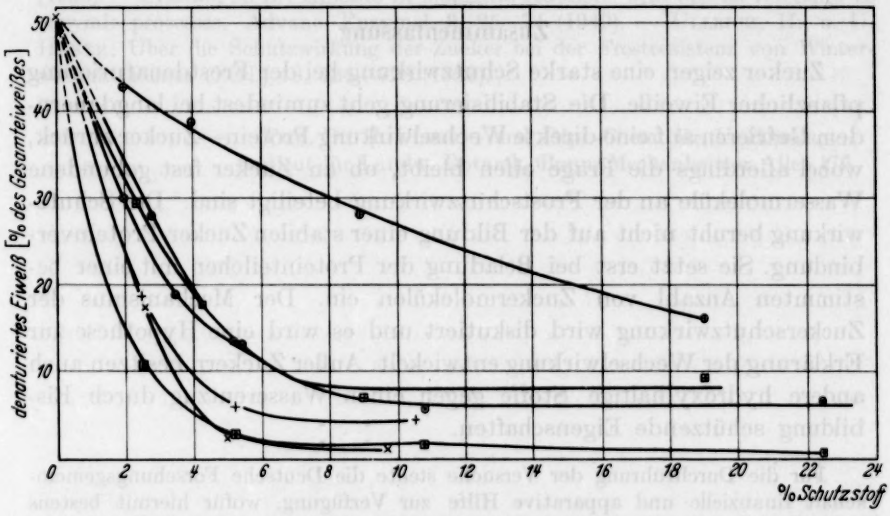


Abb. 5. Schutzwirkung verschiedener hydroxylhaltiger Stoffe auf 2 %ige Eiweißlösungen aus Weizenblättern. Gefrierzeit der Lösungen 24 Stunden. Darstellung wie in Abb. 1. ⊗ Mesoinosit, ⊡ Saccharose, ⊞ Dextrin, ⊕ Mannit (umgerechnet), × Methanol, + Äthylenglykol, ● Cremolan

gleiche Bild, jedoch ist auf der Abszisse der prozentuale Anteil der hydroxylhaltigen Stoffe an der Gesamtlösung aufgetragen. Weiter zeigt Abb. 5 auch die Schutzwirkung höher molekularer Stoffe wie Dextrin und Cremolan (ein Polyoxyäthylenglykol der BASF., Ludwigshafen)

von undefinierter Molekülgröße. Lösliche Stärke übt keine bemerkenswerte Schutzfunktion aus. Aus den Abbildungen ergibt sich klar, daß das Vorhandensein von Hydroxylgruppen für eine gute Schutzwirkung erforderlich ist. Beim Betrachten der molaren Schutzwirkung fällt auf, daß mit abnehmender Molekülgröße bei den Alkoholen auch die Schutzwirkung abnimmt, während sie von der Arabinose an bei den Zuckern mit zunehmender Molekülgröße konstant zu bleiben scheint, wenn eine solche Aussage auch beim Dextrin und der löslichen Stärke wegen der Unkenntnis der genauen Molekülgröße mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist. Über die Ursachen des abweichenden Verhaltens der Alkohole läßt sich noch nichts Sicheres aussagen. Möglicherweise liegen die energetischen Verhältnisse für Wasserstoffbrückenbindungen und Dipolanziehung bei den Zuckern günstiger als bei den Alkoholen. Dafür spricht auch die erstaunlich hohe Differenz zwischen der Schutzwirkung des 6wertigen Alkohols Mannit und des Cyklites Inosit bei an sich weitgehend ähnlichem Bau und der Schutzwirkung der Zucker. Daß die glykosidische OH-Gruppe der Monosaccharide dabei keine Sonderstellung einnimmt, zeigt der gleiche Kurvenverlauf auch bei den nicht reduzierenden Zuckern.

Zusammenfassung

Zucker zeigen eine starke Schutzwirkung bei der Frostdenaturierung pflanzlicher Eiweiße. Die Stabilisierung geht zumindest bei langdauerndem Gefrieren auf eine direkte Wechselwirkung Protein—Zucker zurück, wobei allerdings die Frage offen bleibt, ob an Zucker fest gebundene Wassermoleküle an der Frostschutzwirkung beteiligt sind. Die Schutzwirkung beruht nicht auf der Bildung einer stabilen Zucker-Proteinverbindung. Sie setzt erst bei Beladung der Proteinteilchen mit einer bestimmten Anzahl von Zuckermolekülen ein. Der Mechanismus der Zuckerschutzwirkung wird diskutiert und es wird eine Hypothese zur Erklärung der Wechselwirkung entwickelt. Außer Zuckern besitzen auch andere hydroxylhaltige Stoffe gegen einen Wasserentzug durch Eisbildung schützende Eigenschaften.

Für die Durchführung der Versuche stellte die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanzielle und apparative Hilfe zur Verfügung, wofür hiermit bestens gedankt sei. Frl. v. Fricken danken wir für zuverlässige Mitarbeit.

Literatur

Åkerman, Å.: Studien über den Kältetod und die Kälteresistenz der Pflanzen. Lund 1927. — Anson, M. L.: The Chemistry of the Amino Acids and Proteins, S. 407, 1115 (1944). — Boyer, P. D., G. A. Ballou and J. M. Luck: The combination of fatty acids and related compounds with serum albumin. II. Stabilisation against urea and guanidin denaturation. J. biol. Chem. **162**, 199—208 (1946). —

Boyer, P. D., F. G. Lum, G. A. Ballou, J. M. Luck and R. G. Rice: The combination of fatty acids and related compounds with serum albumin. I. Stabilisation against denaturation. J. biol. Chem. **162**, 181—198 (1946). — Buchanan, T. J., G. H. Haggis, J. B. Hasted and G. B. Robinson: The dielectric estimation of protein hydration. Proc. roy. Soc. A **213**, 379—391 (1952). — Butler, J. A. V.: The energy and entropy of hydration of organic compounds. Trans. Faraday Soc. **33**, 229—236 (1937). — Dole, M., and A. D. McLaren: The free energy, heat and entropy of sorption of water vapor by proteins and high polymers. J. Amer. chem. Soc. **69**, 651—657 (1947). — Ferry, J. D.: Protein gels. Advanc. Protein Chem. **4**, 47 (1948). — Haggis, G. H., J. B. Hasted and T. J. Buchanan: The dielectric properties of water in solutions. J. chem. Phys. **20**, 1452 (1952). — Huggins, M. L.: Hydrogen bridges in organic compounds. J. org. Chem. **1**, 407—456 (1937). — Jeremias, K.: Zur Physiologie der Frosthärtung unter besonderer Berücksichtigung von Winterweizen. Planta (Berl.) **47**, 81—104 (1956). — Levitt, J.: The Hardiness of Plants, S. 111. 1956. — The role of cell sap concentration in frost hardiness. Plant Physiol. **32**, 237—239 (1957). — Mirsky, A. E., and A. L. Pauling: Structure of native, denatured and coagulated proteins. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **22**, 439—447 (1936). — Pisek, A.: Zur Kenntnis der Frosthärte alpiner Pflanzen. Naturwissenschaften **39**, 73—78 (1952). — Porter, V. S., N. P. Denning, R. C. Wright and E. M. Scott: Effects of freezing on particulate enzymes of rat liver. J. biol. Chem. **205**, 883—891 (1953). — Putnam, F. W.: The interaction of proteins and synthetic detergents. Advanc. Protein Chem. **4**, 79 (1948). — Putnam, F. W., in Neurath, H., and K. Bailey: The proteins I B, S. 851 (1953). — Stearn, A. E.: Kinetics of biological reactions with special reference to enzymic processes. Advanc. Enzymol. **9**, 25—74 (1949). — Ullrich, H., u. U. Heber: Über die Schutzwirkung der Zucker bei der Frostresistenz von Winterweizen. Planta (Berl.) **48**, 724—728 (1957).

Prof. Dr. H. Ullrich und Dipl.-Chem. Dr. U. Heber,
Institut für Landw. Botanik, Bonn, Meckenheimer Allee 176

Planta, Bd. 51, S. 414—439 (1958)

Aus dem Botanischen und Pharmakognostischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn

ÜBER VERÄNDERUNGEN DES MECHANISCHEN UND BIOLOGISCHEN KONTAKTES VON PLASMA UND ZELLWAND IN SUBPLASMOLYTISCHEN KONZENTRATIONEN VON ANELEKTROLYTEN

Von

GERHARD SCHAEFER

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Januar 1958)

Einleitung

In früheren Untersuchungen (1955, 1956) konnte Verf. an der Wurzel von *Lemna minor* demonstrieren, daß der Plasmolyseverlauf bei diesem Objekt nicht immer entscheidend von der plasmatischen „Viscosität" her bestimmt wird, sondern sehr oft von dem *Kontakt zwischen Plasma und Zellwand*, der sog. „Wandhaftung". Diese Größe kann im wesentlichen durch 3 zellphysiologische Gegebenheiten hervorgerufen werden: 1. die submikroskopisch feine Verästelung des Plasmas im Fibrillengerüst der Zellwand (FREY-WYSSLING u. Mitarb. 1948, MÜHLETHALER 1953, MÜHLETHALER und LINSKENS 1956); 2. eine hohe Zerreißfestigkeit bzw. Viscosität der Plasmafortsätze und des gesamten Ektoplasmas; 3. das Vorhandensein elektrischer Grenzflächenpotentiale zwischen Plasmaaußenschicht und Zellwand, die das Ablösen auch nicht verästelter Plasmabereiche von der Wand erschweren (SCARTH 1923, WEBER 1924, vgl. p_H-Abhängigkeit, SCHAEFER 1956).

Der auf so verschiedenen Ursachen beruhende Sammelbegriff „Wandhaftung" manifestiert sich bei Plasmolyse in Form einer mechanischen Adhäsion[1] des Plasmas an der Wand, wodurch ursprünglich regelmäßig geformte Protoplasten verzerrt werden und konkave Plasmolyseformen entstehen. Die Dimension muß wie die der physikalischen Adhäsion Kraft/Fläche betragen; sie kann experimentell durch die Konzentrationsdifferenz (Mol/Ltr. oder atm) veranschaulicht werden, die zwischen dem grenzplasmolytisch und dem plasmometrisch ermittelten osmotischen Wert der Zelle besteht (Abb. 2, nähere Einzelheiten siehe dort).

[1] Das Wort „Adhäsion" selbst sollte, wie das auch für den Begriff „Viscosität" gilt, möglichst sparsam im biologischen Sprachbereich gebraucht werden, da seine physikalisch eng umgrenzte Bedeutung der Vielfalt der biologischen Faktoren nicht gerecht wird und allzu leicht zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Sachverhalte führt.

Da die Auswirkungen einer hohen oder ungleichmäßigen Wandhaftung die Bestimmung zellphysiologischer Größen wie die der Plasmolysezeit oder der Zellsaftkonzentration erheblich stören, wird bei *Landpflanzen* schon seit längerer Zeit (FITTING 1915, HÖFLER 1917) das Verfahren des *Wässerns* von Schnitten angewandt, wodurch in den meisten Fällen nachfolgend eine glattere Plasmolyse ermöglicht wird. Das Cytoplasma von *Wasserpflanzen* reagiert verständlicherweise nicht auf diese Art der Vorbehandlung, da die Pflanzen schon unter normalen Bedingungen genügend „gewässert" sind. Nun zeigte sich schon in einer vorangehenden Untersuchung (SCHAEFER 1956), daß durch eine geeignete Behandlung auch hier bei einigen Objekten der Kontakt Plasma-Zellwand verringert werden kann, und zwar durch Vorbehandlung in *knapp hypotonischer Lösung* der anschließend als Plasmolytikum verwendeten Substanz. Das Prinzip dieses Verfahrens bestand darin, den gesamten plasmolytischen Konzentrationssprung in eine noch eben hypotonische Stufe und eine darauffolgende hypertonische Stufe zu zerlegen, um den Abreißeffekt bei Plasmolyse zu mildern und dem Plasma genügend Zeit zu lassen, sich innerhalb der ganzen Zelle von der Wand zu lösen. Das Resultat waren durchweg ausgeglichenere Plasmolyseformen und kürzere Plasmolysezeiten (vgl. Abb. 4 u. 5 dieser Arbeit). Die zeitliche Fraktionierung der Plasmolyse bewährte sich bisher besonders bei der Bestimmung des „Abrundungskoeffizienten" α (SCHAEFER 1955), bei der es auf schnelles und vollständiges Ablösen des gesamten Plasmas von der Zellwand ankommt.

Übrigens sind schon SCARTH und LEVITT (1937) ungewollt auf eine ähnliche Beobachtung gestoßen, indem sie Rindenzellen von *Catalpa* in isotonische Lösung einlegten, die Lösung langsam verdunsten ließen und auf diese Weise konvexere Plasmolyseformen erhielten als bei schneller Plasmolyse. Bezüglich der von ihnen daraus gezogenen falschen Schlüsse auf die „Viscosität" kälteempfindlicher und -resistenter Zellen sei auf die Kritik bei KESSLER und RUHLAND (1938) verwiesen.

Es hat sich nun herausgestellt, daß nicht alle Wasserpflanzen in dieser Weise auf eine hypotonische Behandlung antworten (z. B. *Vallisneria spiralis*, *Ottelia alismoides*). Diese Tatsache läßt schon vermuten, daß wir es bei *Lemna* und den ähnlich reagierenden Objekten nicht einfach mit einer *mechanischen* Auswirkung der osmotischen Entspannung auf die Wandhaftung zu tun haben, sondern daß hier im hypotonischen Medium ganz *spezifische zellphysiologische Prozesse* ablaufen, die nach außen hin als Verringerung der „Adhäsion" in Erscheinung treten. Diese Vorgänge näher zu analysieren, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit. Gleichzeitig sollen ergänzende Befunde zu einer früheren Untersuchung mitgeteilt werden, in der eine Abhängigkeit der Wandhaftung von *Photosynthese und Atmung* bzw. vom CO_2-Gehalt der Zellen festgestellt wurde (SCHAEFER 1956).

Methodisches

Die vorliegende Arbeit stützt sich in der Hauptsache auf Messungen an *Lemna minor*, da diese Pflanze für zellphysiologische Untersuchungen auf breiter Basis besonders geeignet ist (vgl. PIRSON und SEIDEL 1950). Die Anzucht erfolgte unter konstanten Kulturbedingungen: 700 Lux Dauerlicht, 21° C, Nährlösung nach KNOP, Luft-CO_2. Als Vergleichsobjekt diente *Helodea densa* (Anzucht im Warmhaus des Botanischen Gartens Marburg), die wegen der größeren Dicke des Plasmabelages und der Zellwände und wegen des starken Ansprechens der Viscosität auf Außenreize (VIRGIN 1951) einen erwünschten Gegenpart zu *Lemna minor* darstellt, sich in hypotonischen Medien aber ähnlich verhält wie diese (s. Abb. 4 und 5).

Als *Plasmolytica* wurden nur Anelektrolyte verwandt, da diese sich im allgemeinen zellphysiologisch neutraler verhalten als Salzlösungen. Neben den bekannten plasmolytischen Agentien Glucose und Mannit kam hier vor allem das stoffwechselphysiologisch indifferentere Polyäthylenoxyd „Lutrol" in Frage, über dessen Eignung zu plasmolytischen Untersuchungen kürzlich von PIRSON und SCHAEFER (1957) ausführlicher berichtet wurde. Das in dieser Arbeit benutzte Lutrol (Firma BASF, Ludwigshafen) erwies sich bei verschiedenen Grünalgen, Diatomeen und höheren Pflanzen als *ungiftig*. Bedenken gegen seine Anwendung wurden ferner dadurch ausgeschaltet, daß plasmolytische Parallelversuche mit Glucose und Mannit zu gleichen Ergebnissen führten. Auf mögliche Störungen von Versuchsresultaten durch eine schwach oxydierende Wirkung des Polyäthylenoxyds wird weiter unten (S. 425) hingewiesen.

Die Untersuchung der *Wandhaftung* erfolgte mit Hilfe von Plasmolyseform, Plasmolysezeit „PZ" und „Abrundungskoeffizient" α unter gleichzeitiger Kontrolle der *Viscosität* mit Hilfe von Zentrifugiermessungen. Die Temperatur wurde bei all diesen Messungen weitgehend konstant gehalten (Schwankungen höchstens $\pm 0{,}5^0$). Die Zentrifugierung wurde bei der *Lemna*-Wurzel so durchgeführt, daß das Organ in das Lumen einer etwa 2 cm langen Glascapillare eingeführt und an seinem eigenen Schwimmtrieb aufgehängt wurde. Die Wurzel blieb während des Schleuderns von der Versuchsflüssigkeit bedeckt. — Die Blätter von *Helodea* wurden auf Korkstückchen mit einer feinen Nadel befestigt, längs in das Zentrifugierglas eingeführt und ebenfalls mit Versuchslösung völlig bedeckt.

Die *Wachstumsmessungen* erfolgten an besonders gerade gewachsenen, senkrecht im Medium herunterhängenden *Lemna*-Wurzeln mit einem Horizontalmikroskop.

Weitere methodische Daten sind im Text vermerkt.

Experimenteller Teil

1. Wandhaftung und Viscosität. Bei genauer Verfolgung des zeitlichen Verlaufes der Wandhaftungsänderungen im hypotonischen Medium ergibt sich das in Abb. 1 dargestellte Bild: Die Plasmolysezeit sinkt nach Übertragen der Objekte in hypotonisches Medium zunächst langsam, dann rasch und strebt schließlich einem unteren Grenzwert zu, der nach weiterer Vorbehandlung nicht mehr unterschritten wird. Dieser Grenzwert entspricht ganz dem Tiefstwert, der nach längerer *Verdunkelung* von *Lemna*-Pflanzen (>16 Std) erreicht wird (SCHAEFER 1956); er stellt den Anteil an der Gesamt-Plasmolysezeit dar, der nach Eliminierung der Wandhaftung als Auswirkung von Viscosität, Dicke und Oberflächenspannung des Protoplasten übrigbleibt. Der PZ-Grenzwert ist bei älteren Kulturen (Kurve *B*) etwas niedriger als bei jungen Kulturen (Kurve *A*).

Dies entspricht einer früheren Beobachtung, daß die „Abrundungsgeschwindigkeit" in älteren Kulturen größer ist als in jüngeren (1955). Als Ursache hierfür kann unter anderem die geringere Dicke des Plasmabelages älterer Zellen in Betracht gezogen werden. Ferner ist eine Verringerung der Viscosität infolge des geringeren Wasserbindungsvermögens alternder Kolloide nicht ausgeschlossen. Beide Erscheinungen

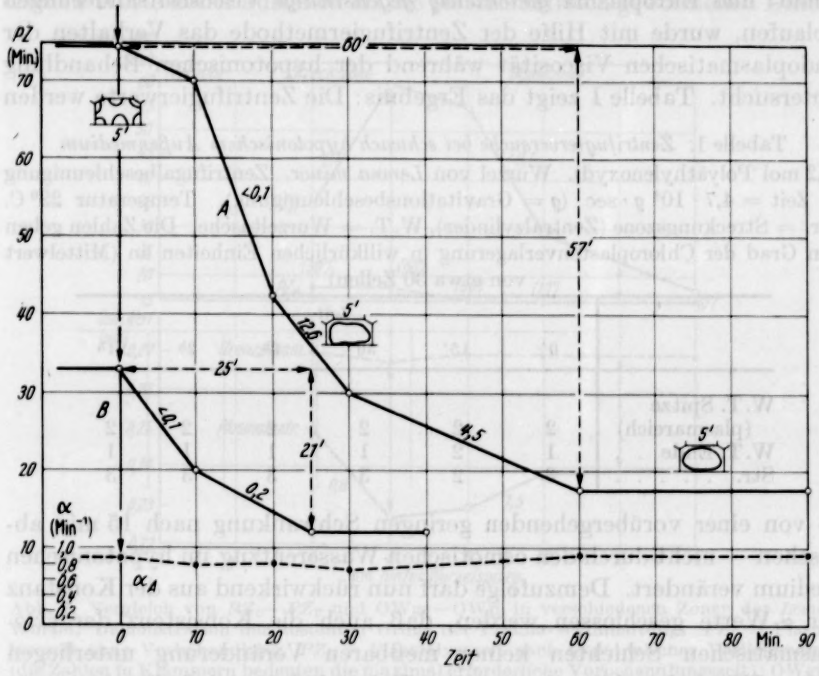


Abb. 1. Plasmolyseform nach 5 Min., Plasmolysezeit und α-Werte der *Lemna*-Wurzel (Ende der Streckungszone) in Abhängigkeit von der Länge der hypotonischen Vorbehandlung. *A*: junge, stark wachsende Kultur (14 Tage alt). *B*: ältere, ausgewachsene Kultur (25 Tage alt). Einlegen in das hypotonische Medium (0,2 mol Polyäthylenoxyd) durch Pfeil markiert. Plasmolyse in 0,4 mol Lösung. Temperatur 21° C. Die Zahlenangaben an den Kurven bedeuten die p-Werte (= Grenzwahrscheinlichkeiten) der jeweiligen Differenzen in %. $p < 5$ % gilt als statistisch gesichert

würden sich in einer Erhöhung der Abrundungsgeschwindigkeit (Erniedrigung des PZ-Grenzwertes) ausdrücken.

Aus dem langsamen Absinken der Plasmolysezeit nach hypotonischer Vorbehandlung der Objekte läßt sich entnehmen, daß nicht die Aufteilung des plasmolytischen Konzentrationssprunges in 2 Stufen als solche die Ursache der gleichmäßigen Plasmolyseformen ist, sondern daß im Verlauf der hypotonischen Behandlung irgendetwas in der Zelle geschieht, was zu einer allmählichen Lockerung des Kontaktes zwischen Plasma und Zellwand und damit bei nachfolgender Plasmolyse zu kürzeren Plasmolysezeiten führt. Aus den α-Werten in Abb. 1 geht hervor,

daß dies *nicht* eine Erniedrigung der durchschnittlichen plasmatischen *Viscosität* (Mittelwert von Endo- und Ektoplasma) sein kann. Die Abrundungskoeffizienten α, die ja einen qualitativen Ausdruck für das Verhältnis $\frac{\text{Grenzflächenspannung}}{\text{Viscosität} \cdot \text{Dicke}}$ des gesamten Plasmas darstellen, bleiben praktisch unverändert. Da dieser Fall auch denkbar ist, wenn in Endo- und Ektoplasma *gleichzeitig gegensinnige* Viscositätsänderungen ablaufen, wurde mit Hilfe der Zentrifugiermethode das Verhalten der endoplasmatischen Viscosität während der hypotonischen Behandlung untersucht. Tabelle 1 zeigt das Ergebnis: Die Zentrifugierwerte werden

Tabelle 1. *Zentrifugierversuche bei schwach hypotonischem Außenmedium* (0,2 mol Polyäthylenoxyd). Wurzel von *Lemna minor*. Zentrifugalbeschleunigung × Zeit = $4{,}7 \cdot 10^4$ $g \cdot$ sec (g = Gravitationsbeschleunigung). Temperatur 22° C. Str. = Streckungszone (Zentralzylinder), W.T. = Wurzeltasche. Die Zahlen geben den Grad der Chloroplastenverlagerung in willkürlichen Einheiten an (Mittelwert von etwa 30 Zellen)

	Zeit					
	0′	15′	30′	1h	2h	24h
W.T. Spitze (plasmareich)	2	2	2	2	2	2
W.T. Ende . .	1	2	1	1	1	1
Str.	3	2	3	3	3	3

— von einer vorübergehenden geringen Schwankung nach 15 min abgesehen — nicht durch den osmotischen Wasserentzug im hypotonischen Medium verändert. Demzufolge darf nun rückwirkend aus der Konstanz der α-Werte geschlossen werden, daß auch die Konsistenz der *ekto*plasmatischen Schichten keiner meßbaren Veränderung unterliegen kann. Wir haben hier ein erneutes Beispiel dafür, daß die apparente Viscosität der plasmatischen Strukturen nicht einfach wie die Viscosität physikalischer Medien unmittelbar von dem Wassergehalt abhängt. Es müssen schon, wie auch BOGEN (1948) im Rahmen einer Untersuchung über Hitzeresistenz feststellte, tiefgreifende Störungen dieser Strukturen infolge einer Verschiebung der intra- und intermolekularen Ladungen eintreten, ehe sich ein Wasserverlust nach außen als Veränderung der Plasmakonsistenz bemerkbar macht. Kleinere Variationen werden anscheinend von der Zelle nach kurzer Zeit wieder selbsttätig reguliert (vgl. die Zentrifugiermessungen an *Helodea*, Abb. 10).

Es sei in diesem Zusammenhang vermerkt, daß man bei Auftreten einer Reaktions- und Restitutionsphase in der „Plasmaviscosität" (STOCKER und ROSS 1956) besonders vorsichtig in der Deutung der Ergebnisse sein sollte, wenn die „Viscosität" mit Hilfe der Plasmolysezeitmethode bestimmt wurde. Diese Methode läßt, wie früher ausführlich demonstriert wurde (SCHAEFER 1955), keine eindeutigen Schlüsse auf die Plasmaviscosität zu, da sie von der Höhe der Wandhaftung entscheidend beeinflußt wird. Es bliebe also zu prüfen, ob die von STOCKER und ROSS

beobachteten Reaktions- und Restitutionsphasen der Plasmolysezeit nicht zum Teil in Veränderungen der *Wandhaftung der Plasmaaußenschicht* lokalisiert sind, die den von uns festgestellten Phänomenen ähneln.

2. Wandhaftung und Grenzplasmolyse. Bei Objekten mit erschwerter Ablösung des Plasmas von der Zellwand (hoher Wandhaftung) kann man häufig feststellen, daß die grenzplasmolytisch ermittelten osmotischen Werte höher ausfallen als die plasmometrisch gewonnenen Daten.

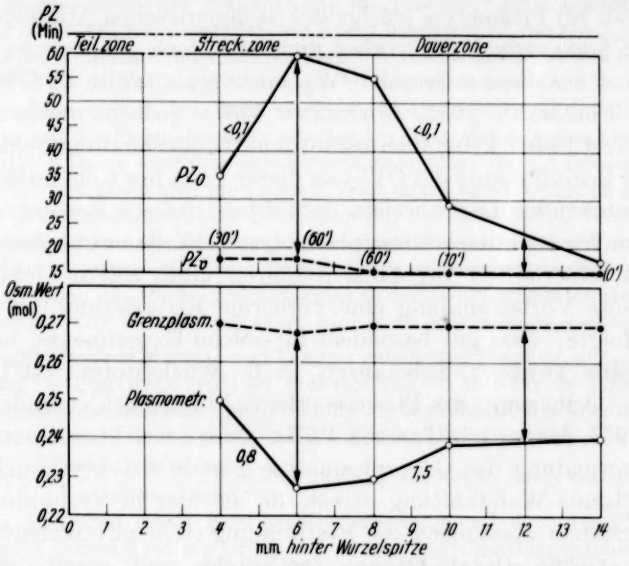


Abb. 2. Vergleich von PZ_0—PZ_v und OWgr—OWpl in verschiedenen Zonen der *Lemna*-Wurzel. Demonstration der absoluten Größe der Plasma-Wandhaftung. PZ_0 = Plasmolysezeit ohne Vorbehandlung, PZ_v = Plasmolysezeit nach hypotonischer Vorbehandlung (die Zahlen in Klammern bedeuten die maximal erforderliche Vorbehandlungszeit); OWgr = grenzplasmolytisch, OWpl = plasmometrisch gewonnener osmotischer Wert. Plasmolyse in 0,4 mol Glucoselösung. Die Zahlen an den Kurven geben die statistischen p-Werte an (vgl. Abb. 1)

Es liegt bei solchen Objekten natürlich nahe, diese Diskrepanz auf einen „Plasmolyseverzug" infolge der starken Bindung zwischen Plasma und Zellwand zurückzuführen. Ein genaueres Studium dieser Verhältnisse an der *Lemna*-Wurzel (Abb. 2) ergab, daß die Differenz $OW_{gr}—OW_{pl}$ am Ende der *Streckungszone* etwa 0,04 mol beträgt, was bei der Versuchstemperatur von 23° C einer Adhäsionswirkung von rund 1 atm (= 1 mp auf einer Zellwand-Fläche von $10\,\mu \times 10\,\mu$) gleichkommt. Wie früher nachgewiesen wurde (1955), ist die Wandhaftung am Ende der Streckungszone der *Lemna*-Wurzel besonders hoch und in der Dauerzone geringer. Tatsächlich ergeben nun die Bestimmungen des osmotischen Wertes, daß die Differenz $OW_{gr}—OW_{pl}$ in der Zone der *ausgewachsenen* Zellen („Dauerzone") *niedriger* ist als in der Streckungszone; wir finden hier einen Wert von 0,03 mol, entsprechend einer Adhäsion von 0,75 atm

(=0,75 mp auf $10 \times 10\,\mu^2$). Der Unterschied zur Streckungszone läßt sich ausreichend statistisch sichern. Insgesamt zeigen die Kurven des osmotischen Wertes in Abb. 2 einen solch spiegelbildlichen Verlauf zu denen der Plasmolysezeit mit und ohne hypotonische Vorbehandlung, d. h. also ohne und mit Wandhaftungseinflüssen, daß man Grund hat, das höhere Ausfallen der grenzplasmolytisch gewonnenen osmotischen Werte tatsächlich als *Adhäsionseffekt* aufzufassen. Es wäre allerdings denkbar, daß bei Plasmolyse infolge des nachgewiesenen Atmungsabfalls (PIRSON u. SCHAEFER 1957) vorher nichtosmotisch gebundenes Wasser frei wird und aus diesem Grunde OW_{pl} niedriger ausfällt als OW_{gr} (vgl. BOGEN u. FOLLMANN 1955, FOLLMANN 1957); jedoch wurde bei der *Lemna*-Wurzel bisher keine nichtosmotische Wasserbindung beobachtet, so daß eine Beeinflussung des OW von dieser Seite her wohl ausscheidet.

Die vorstehenden Daten weisen darauf hin, daß die Bestimmung des osmotischen Wertes mittels Grenzplasmolyse bei Zellen mit hoher Wandhaftung zu fehlerhaften Ergebnissen führen muß, sofern nicht durch eine geeignete Vorbehandlung eine vorherige Reduzierung der Wandhaftung erfolgte. Dies gilt besonders für solche Experimente, in denen durch Zugabe gewisser Substanzen (z. B. Wuchsstoffe, 2,4-Dinitrophenol) die „Adhäsion" des Plasmas offensichtlich stark verändert wird (MASUDA 1957, MASUDA u. TAKADA 1957). Sehr aussichtsreich erscheint aber die Anwendung der Grenzplasmolyse gerade bei Untersuchungen über die Plasma-Wandhaftung selbst, da sie hier in Verbindung mit plasmometrischen Messungen die Bestimmung einer physikalisch exakt definierten Größe (Kraft/Fläche) ermöglicht und somit die aus Plasmolysezeit-Studien gewonnenen, nur halbquantitativen Ergebnisse fruchtbar ergänzt.

Neuerdings haben MASUDA u. TAKADA (1957) eine andere Methode zur zahlenmäßigen Erfassung der „Adhäsion" angegeben. Ausgehend von einer exakten Bestimmung der vom Verf. (1955) eingeführten Größe r ($r = 0/0_{min}$, d. h. das Verhältnis der vorliegenden Protoplastenoberfläche zu der bei gleichem Volumen möglichen Minimaloberfläche), vergleichen sie $\ln r$ mit dem Plasmolysegrad g und finden, daß die zugehörigen Wertepaare $\ln r$ und g im Diagramm auf einer Geraden liegen. Das Steigungsmaß A dieser Geraden wird als „Adhäsionskoeffizient" bezeichnet und aus der Formel $\frac{\ln r}{g} = A$ berechnet. Man sollte aber von einem Koeffizienten erwarten, daß er eine für einen bestimmten Versuchsablauf konstante Größe darstellt. — Dies ist bei dem von MASUDA und TAKADA eingeführten „Adhäsionskoeffizienten" nicht der Fall, wie leicht einzusehen ist: $\ln r$ durchläuft vom Anfangswert an *linear* mit der Zeit (vgl. SCHAEFER 1955) alle Werte bis Null, g aber eine *exponentielle* Kurve bis zum Endplasmolysegrad (Gleichgewicht zwischen Innen- und Außenkonzentration), so daß also das oben definierte A eine während des Plasmolysevorganges veränderliche und allmählich auf Null sinkende Größe ist. Die genannten Autoren sind dem Irrtum unterlegen, das Steigungsmaß einer Geraden mit dem Proportionalitätsfaktor eines linear voneinander abhängigen Wertepaares zu verwechseln. Das Steigungsmaß A der Geraden $\log r = A \cdot (g - 0{,}59)$

(Abb. 3 der diskutierten Arbeit) ist natürlich konstant, aber dieses A errechnet sich nicht aus $A = \frac{\log r}{g}$, sondern im obigen Falle aus $A = \frac{\log r}{g - 0{,}59}$, und allgemein aus $A = \frac{\log r}{g - g_{end}}$. Mit dieser notwendigen Korrektur versehen, scheint dem Verf. der „Adhäsionskoeffizient" A tatsächlich ein recht brauchbares Maß für die Höhe der Plasma-Wandhaftung zu sein. Allerdings muß man sich hier wie bei allen „Adhäsions"bestimmungen mittels der Plasmolyseform darüber klar sein, daß nicht nur die *absolute Größe* der Wandhaftung die Plasmolyseform bestimmt, sondern auch, wie auf S. 431 noch ausführlicher belegt werden wird, der Grad der *Ungleichmäßigkeit* des Kontaktes innerhalb der Zelle. Je unterschiedlicher das Plasma innerhalb einer Zelle an der Wand haftet, um so verzerrter muß auch die entstehende Plasmolyseform werden, was dann zu einem Anstieg von r und damit auch von A führt. Die mit der Plasmolyseform arbeitenden Methoden erlauben also noch keine zuverlässige Aussage über den durchschnittlichen Wert der „Adhäsion" innerhalb einer Zelle. Viel näher wird man diesem Wert durch einen Vergleich grenzplasmolytischer und plasmometrischer Bestimmungen des osmotischen Wertes kommen, wie oben erläutert wurde. Allerdings kann dieses letztere Verfahren exakt nur Aufschluß über den *unteren Grenzwert* der Wandhaftung innerhalb der Zelle geben, da bei Grenzplasmolyse die Ablösung des Plasmas an den Orten geringsten Haftvermögens zuerst erfolgt. Der Durchschnittswert wird mehr oder weniger darüber liegen.

Bezüglich der von MASUDA und TAKADA geäußerten Meinung, der „Abrundungskoeffizient" α (SCHAEFER 1955) sei vielleicht nur ein Maß für die Plasmaviscosität und könne keinen Aufschluß über die Höhe der Wandhaftung geben, muß an dieser Stelle noch einmal betont werden, daß α selbst natürlich nur einen Ausdruck für das Verhältnis $\frac{\text{Oberflächenspannung}}{\text{Viscosität} \cdot \text{Dicke}}$ des Plasmas darstellen kann und soll, daß aber aus dem Verhalten dieses Koeffizienten einerseits und dem der Plasmolysezeit andererseits indirekt auf die Größe der Plasma-Wandhaftung geschlossen werden kann. Einfacher und übersichtlicher gestalten sich die Wandhaftungsbestimmungen jedoch in den Fällen, wo es gelingt, durch eine hypotonische Vorbehandlung den Einfluß der „Adhäsion" zu beseitigen, so daß dann aus der Differenz der Plasmolysezeiten mit und ohne Vorbehandlung die Wirksamkeit dieses Faktors ohne weiteres ersichtlich ist (vgl. die Differenzen PZ_0—PZ_V in den Abb. 1, 2 und 11 dieser Arbeit).

3. Wachstumsgeschwindigkeit und Zellstreckung. Es war zu erwarten, daß mit der Verringerung des Kontaktes zwischen Plasma und Wand in einer hypotonischen Lösung eine Herabsetzung des Streckungswachstums der Zellen verbunden ist, die über die Primärwirkung des Turgorverlustes hinausgeht und sich auch nach Wiedereinstellen der alten osmotischen Spannung noch bemerkbar macht. Beobachtungen ähnlicher Art liegen von LUNDEGÅRDH (1947) vor, der bei Wurzelhaaren eine weitgehende Unabhängigkeit des Wachstums von der Außenkonzentration (also vom Turgordruck der Zellen) feststellte, dagegen aber eine Wachstumshemmung in stärkeren Konzentrationen (0,2 mol Glucoselösung) angibt. Ausführliche Versuche an der *Lemna*-Wurzel lieferten folgendes Ergebnis (Abb. 3): Bei Übertragung der Objekte in ein knapp hypotonisches Medium (0,2 mol Polyäthylenoxyd, Glucose, Mannit) schrumpfen die Wurzeln infolge der verminderten Saugkraft um einen bestimmten

Längenbetrag und zeigen dann in dieser Lösung mehrere Stunden lang praktisch keinerlei Wachstum. Nach Rückführung in das Ausgangsmedium (Nährlösung, ca. 0,02 mol) nehmen die Wurzeln kurzfristig durch osmotische Wasseraufnahme ihre Anfangslänge wieder ein. Das weitere Wachstum ist dann aber, wie erwartet, über einen längeren Zeitraum hinweg gehemmt. Erst nach etwa 14 Stunden kann man eine völlige

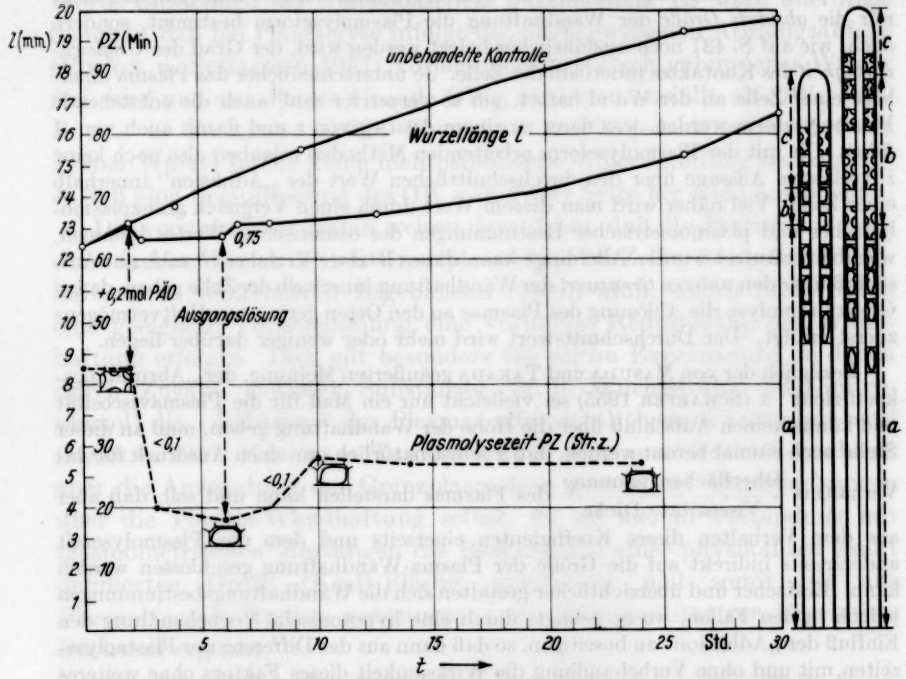


Abb. 3. Wurzellänge (oben), Plasmolyseform und -zeit (unten) und Zellstreckung schematisch (rechts) mit und ohne hypotonische Vorbehandlung. In den Wurzelschemata sind nur die Zellängen maßstabsgerecht gezeichnet. a = Dauerzone zu Beginn der hypotonischen Behandlung, b = Streckungszone während der Zeit der hypotonischen Behandlung, c = nach der hypotonischen Behandlung neugebildete und gestreckte Zone. Plasmolyseformen 5 Min. nach Einlegen in das Plasmolytikum (0,4 mol Polyäthylenoxyd). Über die Zahlenangaben an den Kurven vgl. Abb. 1

Normalisierung der Wachstumsgeschwindigkeit feststellen, die jedoch, wie die Schemata in Abb. 3 zeigen, hauptsächlich auf der Streckung der inzwischen *neugebildeten Zellen* (Abschnitt c) beruht. Eine genaue Lokalisation der Zellstreckung innerhalb der Wurzel ergibt, in Verbindung mit plasmolytischen Studien, daß die zur Zeit der hypotonischen Behandlung als „Streckungszone" vorliegenden Zellen (Abschnitt b des Wurzelschemas) während und nach der Behandlung eine geringe Wandhaftung des Plasmas (konvexe Plasmolyseformen) besitzen und kein nennenswertes Streckungswachstum durchführen. *Auch nach Normalisierung des gesamten Wurzelwachstums bleiben diese Zellen ungestreckt, und ihr Plasma*

löst sich nach wie vor leicht von der Wand. Die osmotisch ausgelöste Adhäsionsverringerung ist also nicht voll reversibel. Der leichte Anstieg der Plasmolysezeit nach Rückführung der Zellen in das Ausgangsmedium (vgl. PZ-Kurve in Abb. 3) beruht wahrscheinlich allein auf dem Wiedereinstellen des Turgordrucks und dem damit verbundenen mechanischen Anpressen des Plasmas gegen die Zellwand.

Ähnliche Erscheinungen sind bei der *Plasmolyse* von Zellen schon längst bekannt. Auch hier wird der Kontakt zwischen Plasma und Wand zerstört und erweist sich dann bei einer zweiten Plasmolyse als stark verringert, so daß völlig konvexe Plasmolyseformen auftreten (Masuda u. Takada 1957). Die einmal plasmolysierten Zellen können zwar nach schonender Übertragung in Normalbedingungen noch wochenlang leben, sind aber zu keinem weiteren Wachstum mehr fähig (Strasburger 1901). Daß diese Verhältnisse nun auch schon nach einer einfachen Entspannung der Zelle in schwach hypotonischer Umgebung, also ohne Plasmolyse, eintreten, ist überraschend. Nach den umfangreichen Plasmodesmenfärbungen Strasburgers (1901) an plasmolysierten und nichtplasmolysierten Zellen ist anzunehmen, daß die biologische und mechanische Lösung des Plasma-Wand-Kontaktes in osmotisch wirksamen Medien allgemein in einer Zurückziehung von Plasmafortsätzen aus der Wand besteht. Da dieser Effekt trotz Wiedereinstellen des alten Turgordrucks nicht voll reversibel ist, scheidet ein rein osmotisch-mechanischer Wirkungsmechanismus als Ursache aus. Das Einschmelzen der Plasmaverästelungen wird vielmehr als eine *aktive* Reaktion („Reizreaktion") der lebenden Zelle auf den osmotischen Außeneinfluß aufgefaßt werden müssen, ein Gedanke, der besonders durch die neueren Untersuchungen von Lambertz (1954) und Schumacher u. Lambertz (1956) über aktive Bewegungen von Ektodesmen nahegelegt wird.

Daß dabei die Atmung der Zellen nicht meßbar verändert wird (Pirson u. Schaefer 1957, Abb. 2), muß nicht gegen diese Konzeption sprechen, denn die zur Durchführung derart diffiziler Reizreaktionen notwendigen Energien können weit unter der manometrischen Meßbarkeitsgrenze liegen.

Im folgenden soll über Versuche berichtet werden, die die Vorstellung von einer Einschmelzung der Plasmafortsätze schon im *hypotonischen* Konzentrationsbereich experimentell erhärten.

4. Tetrazolium-Reduktion in der Zellwand. Durch die Untersuchungen von Currier u. Zweep (1955) ist bekannt geworden, daß die Reduktion von „TTC" (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) zu rotem Formazan durch das lebende Protoplasma bei *Helodea canadensis* nicht nur in der Außenschicht des Plasmas erfolgt, sondern auch in den Randbezirken der *Zellwand*, daß also diese offenbar mit „aktivem" (reduktasehaltigem) Plasma durchsetzt sind. Nach Angabe dieser Autoren unter-

bleibt die Rotfärbung in der Wand, wenn man die Zellen vor Zugabe des TTC plasmolysiert. Auch nach Deplasmolyse tritt zunächst keine Formazanbildung in der Wand mehr auf, während Plasmaoberfläche und Zellorganelle (Plastiden) sich wieder normal rot färben. Man darf hieraus schließen, daß entweder bei Plasmolyse Plasmafortsätze aus der Wand zurückgezogen werden (Anlehnung an die Befunde von STRASBURGER 1901 und LAMBERTZ 1954), oder aber die in der Wand verbleibenden, abgerissenen Plasmaverästelungen bald absterben und zu einer TTC-Reduktion nicht mehr fähig sind. Letzteres mag unter anderem noch durch einen hemmenden Einfluß des TTC auf die aerobe Atmung (THRONEBERRY u. SMITH 1953) mitbeeinflußt sein.

Da bei plasmolytischen Experimenten grundsätzlich schwer zu entscheiden ist, ob das Plasma sich wirklich aus der Wand löst, oder ob die an und in der Wand haftende äußere Grenzschicht abreißt und sich eine neue semipermeable Schicht bildet[1], ist eine Untersuchung der Verhältnisse in knapp *hypotonischem* Medium, also unter *Ausschaltung des Abreißeffektes*, von besonderem Interesse. Die Plasmolyse- und Wachstumsversuche an *Lemna* (Abb. 1, Abb. 3) zeigten schon, daß auch in einem solchen Falle zellphysiologische Veränderungen der Plasmaaußenschicht vor sich gehen, die zu einer Herabsetzung der mechanischen Wandhaftung und zu einem Stillstand des Streckungswachstums führen. Hier scheidet ein Abreißen und damit ein Absterben von Plasmafortsätzen in der Wand aus, und man kann annehmen, daß tatsächlich ein Zurückziehen von Plasmaverästelungen von ihrem Reaktionsort in der Wand die Ursache der genannten Erscheinungen ist.

Für die Nachprüfung dieser Annahme mit Hilfe einer Tetrazoliumprobe erwies sich die Wurzel von *Lemna minor* als ungeeignet, da Zellwände und Plasma zu dünn sind, um eine genaue Lokalisation der Formazanbildung in der Zelle zu ermöglichen. Daher wurde für diese Versuche *Helodea densa* benutzt, deren Blattepidermis genügend dicke Wände besitzt, und die auf eine hypotonische Behandlung mit einer ähnlichen Herabsetzung der Wandhaftung reagiert wie *Lemna minor* (Abb. 4 und 5).

Bei den Tetrazoliumversuchen wurden die Blätter vergleichsweise in Licht (700 Lux) und Dunkelheit 16 Std. lang in einer 0,05%igen TTC-Lösung gehalten, und zwar eine Parallele in Kulturlösung, die andere in 0,2 mol Medium (Kultur-

[1] Auf die neuerdings von WARTENBERG (1957) aufgestellte Theorie einer riesigen „Vacuolisation" des Ektoplasmas als Vortäuschung einer Plasmolyse soll hier nicht näher eingegangen werden, da zu viele Experimentalbefunde gegen die Gültigkeit dieser Theorie sprechen. Es sei auf die Permeabilitätsstudien von RUHLAND, ULLRICH und ENDO (1938) über die Neubildung einer Plasmagrenzfläche, ferner auf die Ausführungen von BENNETT und RIDEAL (1954) und die hier berichteten Tetrazoliumversuche verwiesen. Eine ausführliche Besprechung der Wartenbergschen Ergebnisse hat außerdem schon DRAWERT (1957) an anderer Stelle unternommen.

lösung + Polyäthylenoxyd bzw. Glucose); p_H-Wert beider Lösungen um 6,8. Die Zugabe des TTC zu den hypotonischen Lösungen erfolgte erst, nachdem die Blätter schon $1^1/_2$ Std in diesen gelegen hatten und somit die Reaktion auf die hypotonische Behandlung (Zurückziehung des Plasmas aus der Wand) eingesetzt haben mußte. Da sich in Blindversuchen eine schwach oxydierende Wirkung des Polyäthylenoxyds (Hemmung der TTC-Reduktion) herausgestellt hatte, wurden Vergleichsexperimente ebenfalls mit Glucose ausgeführt, die wegen ihrer reduzierenden

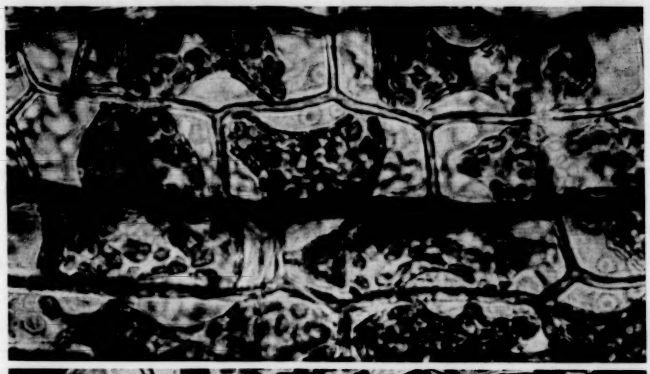


Abb. 4

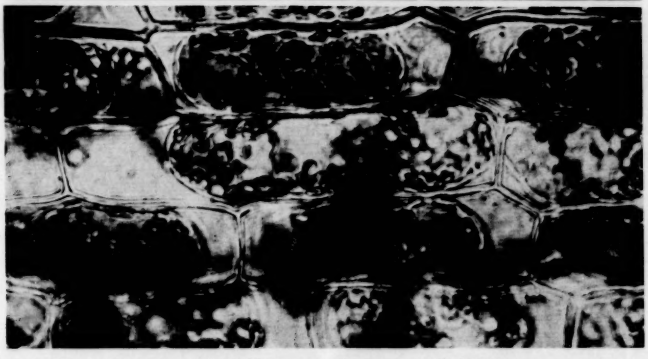


Abb. 5

Abb. 4. Plasmolyseformen im Blattfeld von *Helodea* nach 10 Min. Plasmolyse; nicht vorbehandelte Kontrolle. Blatt 1 cm unterhalb Spitze. Plasmolytikum: 0,4 mol Polyäthylenoxyd. Gesamtvergr. 1400 ×

Abb. 5. Desgleichen nach 16 Std. Vorbehandlung in 0,2 mol Nährlösung-Polyäthylenoxyd

Eigenschaft die Formazanbildung nachweisbar beschleunigt[1]. Es zeigte sich, daß zwar die *Geschwindigkeit* der Formazanbildung von der Art des Osmotikums abhängt, nicht aber der *Ort* der Reaktion. In beiden Lösungen wurden die nachstehend beschriebenen Phänomene beobachtet (die mikroskopischen Bilder sind in natura wegen der Farbkontraste rot-weiß in den Zellwänden sehr viel eindrucksvoller und lassen sich durch Schwarz-Weiß-Photographien nur annähernd wiedergeben):

Die von CURRIER u. ZWEEP beobachtete Rotfärbung mehrerer Zellwanddistrikte in Normalzellen konnte, vor allem im Licht, bestätigt

[1] Die Beschleunigung der Formazanbildung ist bei Anwendung von *Saccharoselösungen* (CURRIER u. ZWEEP) noch sehr viel stärker als bei Glucose und sollte daher in solchen Experimenten unbedingt beachtet werden.

Abb. 6

Abb. 7

Abb. 8

Abb. 9

Abb. 6. *Helodea*-Zellen nach 16 Std. in Nährlösung + 0,05 % TTC. Temperatur 24° C. Beleuchtungsstärke 700 Lux. Gesamtvergr. etwa 2 200 ×. Pfeile markieren die mit Formazan gefärbten Wandbereiche

Abb. 7. Desgleichen nach 16 Std. in 0,2 mol Nährlösung-Polyäthylenoxyd + 0,05 % TTC. TTC-Zugabe $1^1/_2$ Std. nach Beginn der Vorbehandlung. Pfeile markieren die sonst mit Formazan gefärbten, hier ungefärbten Wandbereiche

Abb. 8. Wie Abb. 6, plasmolysiert. — Abb. 9. Wie Abb. 7, plasmolysiert

werden (Abb. 6). Diese Färbung unterbleibt aber in einem knapp hypotonischen Medium, also schon *vor* der eigentlichen Plasmolyse (Abb. 7). Bei anschließender Plasmolyse bleibt dann nur ein ganz schmaler, oft granulös erscheinender roter Saum[1] am Rande der Zellwand zurück (Abb. 9), während die Wände der nicht vorbehandelten Kontrollen in breiten Streifen rot gefärbt bleiben (schwarze Stellen in Abb. 8). Werden die Zellen schon *vor* Zugabe des TTC voll plasmolysiert, so ist gar keine Formazanbildung in oder an der Wand zu beobachten, was den Befunden von CURRIER u. ZWEEP genau entspricht.

Es ist also nach diesen Beobachtungen als höchst wahrscheinlich anzusehen (bezüglich der Kritik dieser Deutung siehe Diskussion), daß sich *durch den Einfluß des knapp hypotonischen Mediums die in die Wand vorgedrungenen Plasmafelder zurückziehen und dann bei Plasmolyse zum Teil als formazanspeichernde (lipoidreiche) Granula an der Innenseite der Wand zurückbleiben. Dagegen scheint in unbehandelten Zellen bei Plasmolyse ein Abreißen ganzer Teile des Außenplasmas in der Membran stattzufinden.*

Im folgenden Kapitel soll über weitere Anhaltspunkte für die oben geforderte *vitale* Natur der Plasmodesmenzurückziehung berichtet werden.

5. Plasmaströmung und Viscosität. Es wurde schon mehrfach begründet, daß als Ursache des Zurückziehens der Plasma-„Pseudopodien" aus der Zellwand hier nicht einfach die osmotische Entspannung der Zelle im hypotonischen Medium in Frage kommt, sondern daß man in dieser Erscheinung einen aktiven Lebensprozeß der Zelle erblicken muß. Die Gründe für diese Annahme seien noch einmal zusammengestellt:

1. Nicht alle Wasserpflanzen reagieren auf die osmotische Entspannung modellartig mit einer Verminderung der Wandhaftung. Es liegen individuelle Unterschiede vor, die sich am ehesten mit einer verschiedenen Reaktionsweise der einzelnen Plasmen erklären lassen.

2. Würde die Wandhaftung nur eine einfache Folge der durch Turgordruck in die Wand vorgetriebenen Plasmaverästelungen sein, so müßte man erwarten, daß die beobachtete Herabsetzung im hypotonischen Medium reversibel sei. Tatsächlich aber bleiben sowohl Wandhaftung als auch Streckungswachstum nach Wiedereinstellen des alten Turgordrucks vermindert. Dies läßt den Schluß zu, daß das Vordringen von Plasmabereichen in die Wand, wie auch der umgekehrte Vorgang, aktive Lebensprozesse sind und keine einfache Folge osmotischer Druckänderungen.

3. Die von LAMBERTZ (1954) und SCHUMACHER u. LAMBERTZ (1956) berichteten Veränderungen der Zahl der Außenwandplasmodesmen

[1] Vgl. den granulösen Wandbelag in stark vergilbten Blättern von *Passiflora quadrangularis*, deren Außenwandplasmodesmen in diesem Zustand völlig zurückgezogen sind (LAMBERTZ 1954, Abb. 23).

lassen sich ebenfalls nicht osmotisch erklären, sondern sprechen für eine vitale Reaktion der Zelle auf Außenreize.

Bei der Suche nach weiteren Anhaltspunkten für eine „Reizwirkung" der hypotonischen Behandlung fiel unser Augenmerk auf die *Plasmaströmung* von *Helodea densa*, die ja seit jeher als ein anschaulicher Indicator für die Reizung einer Zelle gilt. Die Experimente wurden

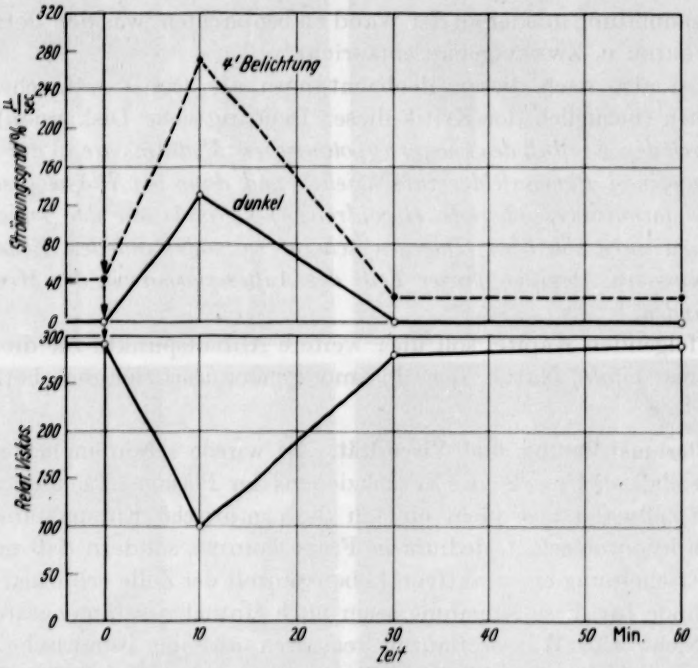


Abb. 10. Oben: „Strömungsgrad" (Prozentsatz strömender Zellen × Strömungsgeschwindigkeit) in der Mittelrippe des Blattes von *Helodea* in Abhängigkeit von der Länge der hypotonischen Behandlung in 0,2 mol Nährlösung-Polyäthylenoxyd. Temperatur 24° C. Messung der Strömungsgeschwindigkeit mit Okularmikrometer. Unten: „Relative Viscosität" zum Vergleich. Zentrifugiermessungen. Erläuterung der Ordinate: Die Summe der prozentualen Chloroplastenverlagerung von Basis, Mitte und Spitze des Blattes = „Verlagerungssumme" (Höchstwert 300 %). 300-Verlagerungssumme = rel. Viscosität

unter den gleichen Bedingungen und am gleichen Material wie die bisher besprochenen (Abb. 4 und 5) durchgeführt und ergaben, daß durch Einwirkung knapp hypotonischer Lösungen von Anelektrolyten die *Plasmaströmung vorübergehend stark erhöht* wird (Abb. 10, „dunkel").

Die Reaktion ist besonders deutlich in den Zellen der Mittelrippe zu beobachten, da in diesen die Plasmaströmung sehr groß ist und daher auch die größten absoluten Unterschiede aufweist. Schwächere, aber grundsätzlich gleiche Veränderungen treten auch in den Zellen der Blattfläche beiderseits der Mittelrippe auf. Die Dunkelwerte wurden in der Weise ermittelt, daß die Objekte, die vorher in Schwachlicht von etwa 15 Lux vorbehandelt wurden, bei der gleichen Beleuchtung auf den Objekttisch des Mikroskopes gebracht, eingestellt und dann sofort bei Einschalten

der Mikroskopbeleuchtung registriert wurden. Die strömungsfördernde Wirkung einer 10minütigen hypotonischen Vorbehandlung war unmittelbar zu erkennen.

Das Einwirken stärkerer *Lichtreize* ruft bekanntlich bei *Helodea*-Zellen in vielen Fällen eine starke Plasmaströmung hervor. So auch hier: nach 1—4minütiger mikroskopischer Beleuchtung (ca. 1180 Lux) nimmt der Strömungsgrad der Zellen deutlich zu. Die Lichtreaktion ist besonders stark zu der Zeit, in der der osmotische Reiz sein Wirkungsmaximum erreicht (etwa 10 min nach Einlegen in das hypotonische Medium), und nimmt dann wieder ab. Dies ließ vermuten, daß der osmotische Einfluß in erster Linie die allgemeine „Strömungsfähigkeit" des Plasmas, d. h. also die Viscosität, verändert und nicht über die strömungsauslösenden Faktoren, die „motive force", wirkt.

Zentrifugierversuche bestätigten diese Annahme: Mit der Erhöhung des Strömungsgrades nach 10 min Vorbehandlung läuft ein Absinken der Plasmaviscosität parallel (Abb. 10). Dieser Effekt klingt ebenso wie die Strömungszunahme nach 20—30 min wieder völlig ab, worauf dann die Viscosität konstant bleibt (vgl. die entsprechenden Befunde an der *Lemna*-Wurzel, S. 418.)

Es ist also sehr wahrscheinlich, daß das Einsetzen bzw. die Erhöhung der Plasmaströmung hier lediglich auf der vorübergehenden Erniedrigung der Viscosität beruht; damit ist nicht ausgeschlossen, daß unter Umständen eine geringe Erhöhung der „motive force" mitbeteiligt sein kann, denn eine Koppelung des Verhaltens beider Größen auf Grund gleicher intermolekularer Veränderungen ist sehr wohl denkbar.

Die Reversibilität der Viscositätsänderungen unter *gleichbleibenden* Außenbedingungen deutet auf eine *Selbstregulierung* der plasmatischen Strukturen hin, wie sie auch Stålfelt (1949) an *Helodea* und Northen (1943) bei Austrocknungsversuchen an Moosblättern beobachtet haben, und die wohl im einzelnen in einer Reassoziation von Proteinketten besteht, deren zwischenmolekulare Bindungen durch den plötzlichen osmotischen Wasserentzug vorübergehend gestört waren. Diese Regulierungsprozesse im Binnenplasma lassen sich mit gutem Recht als „Reizreaktionen" der lebenden Zelle auffassen und lassen vermuten, daß auch in der äußeren Plasmagrenzzone ähnlich vitale Vorgänge ablaufen.

6. Licht-Dunkel-Wirkungen auf die Wandhaftung. Verdunkelt man Pflanzen einer mehr als 14 Tage alten *Lemna*-Kultur mehrere Stunden lang, so sinkt die Plasmolysezeit der Wurzel allmählich ab und erreicht nach etwa 16 Std. den oben schon erwähnten Grenzwert von rund 15 Min. Es konnte früher gezeigt werden (Schaefer 1956), daß dieses Absinken lediglich auf einer — wahrscheinlich durch p_H-Einflüsse bewirkten — Lösung des mechanischen Kontaktes von Plasma und Zellwand beruht (Abb. 11). Mit dieser Erscheinung ist, genau so wie bei den in Abb. 3 dargestellten Versuchen, auch eine Lösung des *biologischen* Kontaktes

verbunden, erkennbar an einem Nachlassen des Streckungswachstums. Die Hemmung des Wachstums im Dunkeln beruht im wesentlichen nicht auf eintretendem Kohlenhydratmangel (Zuckerzugabe ist ohne Einfluß), sondern wurde seinerzeit schon als Folge eines Rückzuges des Plasmas von seinen Reaktionsorten in der Zellwand aufgefaßt.

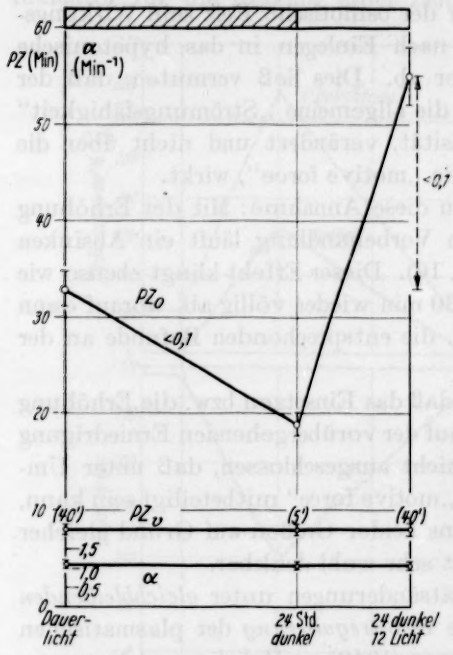


Abb. 11. Plasmolysezeit nicht vorbehandelter (PZ_0) und hypotonisch vorbehandelter (PZ_V) *Lemna*-Wurzeln und die zugehörigen α-Werte nach Verdunkelung und Wiederbelichtung mit 700 Lux Glühlicht. Die Zahlen über den PZ_V-Werten bedeuten die maximal erforderlichen Vorbehandlungszeiten. Die eingetragenen Streubereiche geben die „mittleren Fehler" ($\pm \sigma_M$) der Mittelwerte an

Die mit Tetrazoliumsalzen durchgeführten Versuche dieser Arbeit geben nun eine anschauliche Bestätigung dieser Annahme: Beim Vergleich der in Licht und Dunkelheit gehaltenen Pflanzen konnte die Feststellung gemacht werden, daß im Licht nicht nur eine *verstärkte* Formazanbildung vorliegt (wohl wegen der Erhöhung des Reduktionspotentials der Zelle), sondern daß die *rot gefärbten Plasmabereiche sehr viel tiefer in die Wand hineinragen* als im Dunkeln. Dies wird sehr deutlich bei Gegenüberstellung der Abb. 8 (Lichtversuch) mit den von CURRIER u. ZWEEP (1955) abgebildeten *Helodea*-Zellen (Dunkelbehandlung). Die im Dunkeln gehaltenen Zellen zeigen nach entsprechend langer Versuchszeit (meist mehr als 16 Std) eine randständige, zum Teil granulöse Formazanfärbung, die ganz dem nach hypotonischer Behandlung erhaltenen Bilde (Abb. 9) gleicht. Es scheint damit unsere frühere Auffassung genügend begründet, daß die Verminderung der Wandhaftung im Dunkeln, genau so wie die im hypotonischen Medium, letztlich auf einer Zurückziehung von Plasmafortsätzen aus der Zellwand beruht.

Nach Wiederbelichtung steigt die Plasmolysezeit der *Lemna*-Wurzel langsam wieder an, erreicht vorübergehend supranormale Werte (Abb. 11), und stellt sich dann wieder auf den Ausgangswert ein. Dieser weit über das Normalniveau hinausführende Anstieg der PZ wurde seinerzeit als Folge einer erhöhten *Ungleichmäßigkeit* der Wandhaftung innerhalb der Zelle gedeutet, die sich mit Wiederaufnahme des Streckungswachstums

und der Stoffleitung im Licht einstellt. Als Gründe für diese Annahme wurden unter anderem das Auftreten stark unregelmäßiger Plasmolyseformen in stark wachsenden oder stoffleitenden Zellen der *Lemna*-Wurzel und anderer Objekte, sowie auch die inzwischen durch elektronenoptische Aufnahmen mehrfach verifizierte Existenz eines „Mosaikwachstums" der Zellwand (Frey-Wyssling 1950) angeführt. Die Ergebnisse der Formazanfärbung sprechen deutlich für die Richtigkeit dieser Auffassung: Es ist durchweg festzustellen, daß in Normalzellen nicht die ganzen Zellwände gleichmäßig rot gefärbt werden, sondern immer nur einzelne Abschnitte besonders stark (Abb. 6). Eine solch lokale Begrenzung des Plasmas in der Zellwand kann einerseits sehr gut die geforderte Unterschiedlichkeit des mechanischen Kontaktes, andererseits auch die mosaikartige Zonierung des Zellwandaufbaus erklären.

Die supranormale Erhöhung der PZ nach Wiederbelichtung läßt sich, wie Abb. 11 zeigt, durch eine hypotonische Behandlung beseitigen, und zwar sinkt die PZ auf den gleichen Endwert PZ_V wie bei den Dauerlicht- und Dunkelpflanzen. Dies weist, wie auch die Konstanz der α-Werte, erneut darauf hin, daß die Licht-Dunkelwirkungen sich hier tatsächlich nur auf die Plasma-Wandhaftung erstrecken und nicht auf Viscosität, Oberflächenspannung oder Dicke des Plasmabelages. Eine genaue Analyse der optimalen *Vorbehandlungszeiten*, die an der Kurve PZ_V in Abb. 11 vermerkt sind, bringt noch einmal die Bestätigung früherer Befunde: Die nach 12 Std Wiederbelichtung notwendigen Vorbehandlungszeiten sind *nicht*, wie zunächst aus dem PZ-Gipfel zu erwarten wäre, größer als bei Dauerlichtzellen, sondern etwa *genau so groß*. Da nach den Erfahrungen an jungen und alten Pflanzen (Abb. 1) eine erhöhte Wandhaftung fast immer eine erhöhte Vorbehandlungszeit bedingt, und umgekehrt, so ergibt sich aus der auftretenden Diskrepanz zwischen PZ und Vorbehandlungszeit ein weiteres Kriterium dafür, daß nach Wiederbelichtung keine *absolute* Erhöhung der durchschnittlichen Wandhaftung über den Normalstatus hinaus eintritt, sondern nur die oben geschilderte *Ungleichmäßigkeit* innerhalb der Zelle. Aus dieser läßt sich das Auftreten stärker konkaver Plasmolyseformen und damit supranormaler Plasmolysezeiten bei *gleichbleibendem* Durchschnittswert der Wandhaftung zwanglos erklären.

Diskussion

Mit der vorliegenden Untersuchung wird insgesamt ein Beitrag zum Thema „Beweglichkeit von Plasmodesmen"[1] gegeben, ein Thema, das schon vor geraumer Zeit diskutiert wurde, und das auch heute immer noch im Brennpunkt des Interesses steht. Bisherige Arbeiten stützen sich zum Nachweis der Beweglichkeit von Plasmodesmen zumeist auf *Färbe*methoden, teils an fixierten Objekten (Strasburger 1901, Mühldorf 1937, Lambertz 1954 usw.), teils an lebenden Organismen (Bennett u. Rideal 1954, Currier u. Zweep 1955).

[1] Der Kürze halber sei hier das Wort „Plasmodesmen" verallgemeinert für alle in die Wand vordringenden (also auch die blind endenden) Plasmafortsätze gebraucht.

Obwohl die Vitalfärbungen wegen der geringeren Artefaktbildung im allgemeinen höher zu bewerten sind als Färbungen an fixierten Objekten, so darf doch nicht übersehen werden, daß gerade im Falle der Formazanfärbung (CURRIER u. ZWEEP, Abb. 6—9 dieser Arbeit) Plasmodesmen und Plasmodesmenbewegungen in der Wand vorgetäuscht werden können, die im Grunde nur auf der verschiedenen Lipoidlöslichkeit (Formazanspeicherung) einzelner Zellwandbereiche beruhen. WERGIN (1943) weist ausführlich auf die Existenz solcher lipoidhaltiger Bereiche hin. Eine Vortäuschung von Plasmodesmen ist zwar in den Fällen, wo eine deutliche Beweglichkeit der gefärbten Bezirke in der Wand feststeht, nicht anzunehmen, da außerplasmatische Zellwandlipoide wohl kaum eine aktive Beweglichkeit besitzen dürften, jedoch bedarf es in allen solchen Fällen weiterer Beweise, um sichere Schlüsse aus den Farbverschiebungen ziehen zu können. *Die in dieser Arbeit mitgeteilten Befunde über simultane Veränderungen der mechanischen Wandhaftung des Plasmas und des Streckungswachstums bestätigen die aus den Färbeversuchen bisher gezogenen Schlüsse.*

Eine Beweglichkeit von Plasmafortsätzen in der Zellwand wurde schon vielfach von seiten der Zellwandforscher postuliert (z. B. FREY-WYSSLING 1950, SITTE 1955, MÜHLETHALER u. LINSKENS 1956) und drängt sich dem Beobachter in all den Fällen besonders auf, wo gekoppelte Veränderungen von Wachstum und mechanischer Wandhaftung erfolgen. Die Verästelungen ziehen sich offenbar bei Einwirkung bestimmter äußerer oder innerer Faktoren zurück und erscheinen dann nach Anfärbung meist als granulöser Saum am Innenrand der Zellwand (STRASBURGER 1901, LAMBERTZ 1954, CURRIER u. ZWEEP 1955, Abb. 9 dieser Arbeit). Zu den inneren Ursachen solcher Plasmodesmenbewegungen zählen z. B. Wachstum und Alter von Zellen (LAMBERTZ 1954, SCHAEFER 1955, 1956, GÜNTHER 1957), zu den äußeren Einflüssen Licht und Dunkelheit (Abb. 11), osmotischer Wasserentzug (s. vorliegende Arbeit), thermische oder chemische Ursachen (BENNETT und RIDEAL 1954, LAMBERTZ 1954, SCHUMACHER u. LAMBERTZ 1956).

Ob bei dem Rücktritt des Plasmas aus der Wand neue Verästelungen entstehen und dadurch die äußere Oberfläche des Protoplasten *zunimmt*, wie BENNETT und RIDEAL (1954) aus Widerstands- und Kapazitätsmessungen an der lebenden Zelle schließen, oder ob vorwiegend schon vorhandene Fortsätze eingeschmolzen werden und dadurch die Gesamtoberfläche *verringert* wird, läßt sich nur von Objekt zu Objekt gesondert entscheiden, denn die primäre Oberflächengestalt wird bei den einzelnen Zelltypen sehr verschieden sein. In unserem Falle sprechen die Herabsetzung der mechanischen Wandhaftung und das Verschwinden der zonal begrenzten Formazanfärbung in der Zellwand eher für eine *Reduzierung* der Plasmafortsätze und damit für eine Verringerung der äußeren Grenz-

fläche. Ein Nachweis durch Permeabilitätsstudien läßt sich hierfür nicht führen, da die wirksamere Sperrschicht für permeierende Stoffe der Tonoplast ist und dieser in seiner Größenausdehnung von den ektoplasmatischen Vorgängen unberührt bleibt.

Betrachtet man den Protoplasten als einfaches physikalisches System und die chemische Struktur seiner beiden Grenzschichten als konstant, so muß man in der Tat die Beobachtungen von BENNETT u. RIDEAL im Sinne einer *Vergrößerung* der äußeren Oberfläche bei zunehmender Außenkonzentration deuten. Zieht sich also das Plasma aus der Wand zurück (was die genannten Autoren aus dem tieferen Eindringen einer Farbstofffront von saurem Fuchsin in die Membran schließen), so bleibt als Erklärung des Oberflächenzuwachses nur die Hypothese einer verstärkten Verästelung und Ausspinnung von Plasmafäden in der Wand während des allgemeinen Rückzuges. Nun sind aber die angegebenen Versuche nur mit Elektrolytlösungen ausgeführt, deren Kationen (H^+, NH_4^+, Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++}) bekanntlich die verschiedensten zellphysiologischen Nebenwirkungen ausüben, so daß also sehr fraglich ist, ob die Modellvorstellung einer strukturell konstanten Plasmagrenzfläche überhaupt Gültigkeit besitzt. Wie BENNETT u. RIDEAL selbst angeben, wird bei Zugabe *wachstumsaktiver Substanzen* (chlorierte Phenoxyessigsäuren, IES) zwar der elektrische Widerstand der Grenzschicht stark erhöht (was nach der obigen Auffassung auf eine Verminderung der Oberfläche hinweisen würde), aber die Kapazität, die ja in gleicher Weise linear von der Fläche abhängt, bleibt unverändert. Die Autoren schließen daraus, daß im Fall einer Wuchsstoffbehandlung weniger eine *Größen*veränderung als vielmehr eine chemische *Struktur*veränderung der Plasmagrenzschicht erfolgt. Meines Erachtens gilt aber dieses Argument in gleicher Weise auch für die Versuche mit *Ionenlösungen*. Es wäre sehr zu wünschen, daß ähnliche Experimente einmal unter rein osmotischen Gesichtspunkten mit verschiedenen *Anelektrolyten* ausgeführt würden. Dies erscheint um so wünschenswerter, als gerade mit der oben besprochenen Methodik sehr schön eine Größenveränderung der Plasmaoberfläche schon in *knapp hypotonischen* (subplasmolytischen) Konzentrationen zutage tritt, die dann ihr Maximum bei Beginn der Plasmolyse erreicht (BENNETT u. RIDEAL 1954, Fig. 3—5); dieser Befund könnte, mit Hilfe zellphysiologisch neutralerer Osmotica verifiziert, eine weitere Stütze für die Vorstellung von Plasmodesmenverschiebungen in hypotonischen Medien sein.

Fragen wir uns nun nach dem *Mechanismus*, über den das hypotonische Außenmedium die Plasmodesmeneinschmelzung auslöst. Das schon seit STRASBURGERs Untersuchungen (1901) bekannte und neuerdings auch von LAMBERTZ (1954) wieder bestätigte Verschwinden der färbbaren Plasmafortsätze bei *Plasmolyse* bereitete dem Verständnis keine Schwierigkeiten, da hier eine rein mechanische Zurückdrängung der semipermeablen Außenschicht durch die hypertonische Lösung im Spiele sein mag. Eine ähnliche Erklärung könnten zunächst auch die Reaktionen in *subplasmolytischen* Konzentrationen finden, in der Weise, daß bei Aufhebung des Vacuolendrucks die Plasma-„Pseudopodien" der Oberflächenspannung gehorchend aus den Interstitien der Wand zurücktreten (BENNETT u. RIDEAL).

Bei dieser Art der Erklärung müßte allerdings eine durchaus noch nicht bewiesene Prämisse angenommen werden, daß nämlich der Benetzungswinkel der Plasmafortsätze in den Capillaren der Zellwand größer als 90° ist und demzufolge

das Plasma nur unter Druck *gegen* die Wirkung der Oberflächenspannung in die Wand vorgetrieben werden kann. Es besteht aber bislang, solange die Lipoid-Eiweiß-Struktur der Plasmagrenzfläche sowie auch der Lipoidgehalt der Zellwand selbst (WERGIN 1943) noch nicht im einzelnen bekannt sind, kein Grund zu der Annahme einer wirklichen Nichtbenetzbarkeit von Wand und Plasma. Außerdem müßte, falls die Grenzflächenspannung tatsächlich der dominierende physikalische Faktor bei der Plasmodesmenzurückziehung sein sollte, eine Beeinflussung des Phänomens durch Außenlösungen mit verschiedener Oberflächenspannung zu erwarten sein. Es zeigte sich aber bei vergleichender Anwendung isotonischer Lösungen von Glucose und Polyäthylenoxyd, deren Spannungen etwa 71 dyn/cm und 57 dyn/cm betrugen (vgl. PIRSON und SCHAEFER 1957), daß die Wirkung der hypotonischen Behandlung in keiner erkennbaren Weise von der Oberflächenspannung des Außenmediums abhängt.

Die Tatsache, daß nicht alle Wasserpflanzen auf eine osmotische Entspannung mit einer Erniedrigung der Wandhaftung reagieren, deutete schon darauf hin, daß die Verhältnisse hier komplizierter liegen müssen und nicht mit Hilfe solch einfacher physikalischer Modelle erklärt werden können. Die Beobachtungen von LAMBERTZ (1954) und SCHUMACHER u. LAMBERTZ (1956) über das Zurückziehen von Ektodesmen lassen z. B. eine osmotisch-mechanische Erklärungsweise überhaupt nicht zu, sondern sprechen stark für eine *vitale* Natur solcher Phänomene. Auch die Vielfalt der Außenfaktoren (Licht-Dunkelheit, Temperatur, osmotischer Wasserentzug usw.), die alle den gleichen Effekt einer Plasmodesmenverschiebung hervorrufen können, erlaubt einen ähnlichen Schluß; man vergleiche z. B. die Verschiedenartigkeit der Faktoren, die im Blattgelenk der Mimose die gleichen Reizreaktionen auslösen. In unserem Falle spricht zudem die Feststellung der *mangelnden Reversibilität* der Wandhaftungsänderungen (S. 423) gegen einen einfachen Druck-Oberflächenspannungs-Mechanismus, wie er oben erläutert wurde; die Tatsache, daß der einmal gelöste Kontakt von Plasma und Zellwand auch nach Wiedereinstellen des alten Turgordrucks von etwa 5 atm nicht voll wiederhergestellt wird, läßt sich am ehesten mit einer *physiologischen Reaktion der lebenden Zelle* erklären.

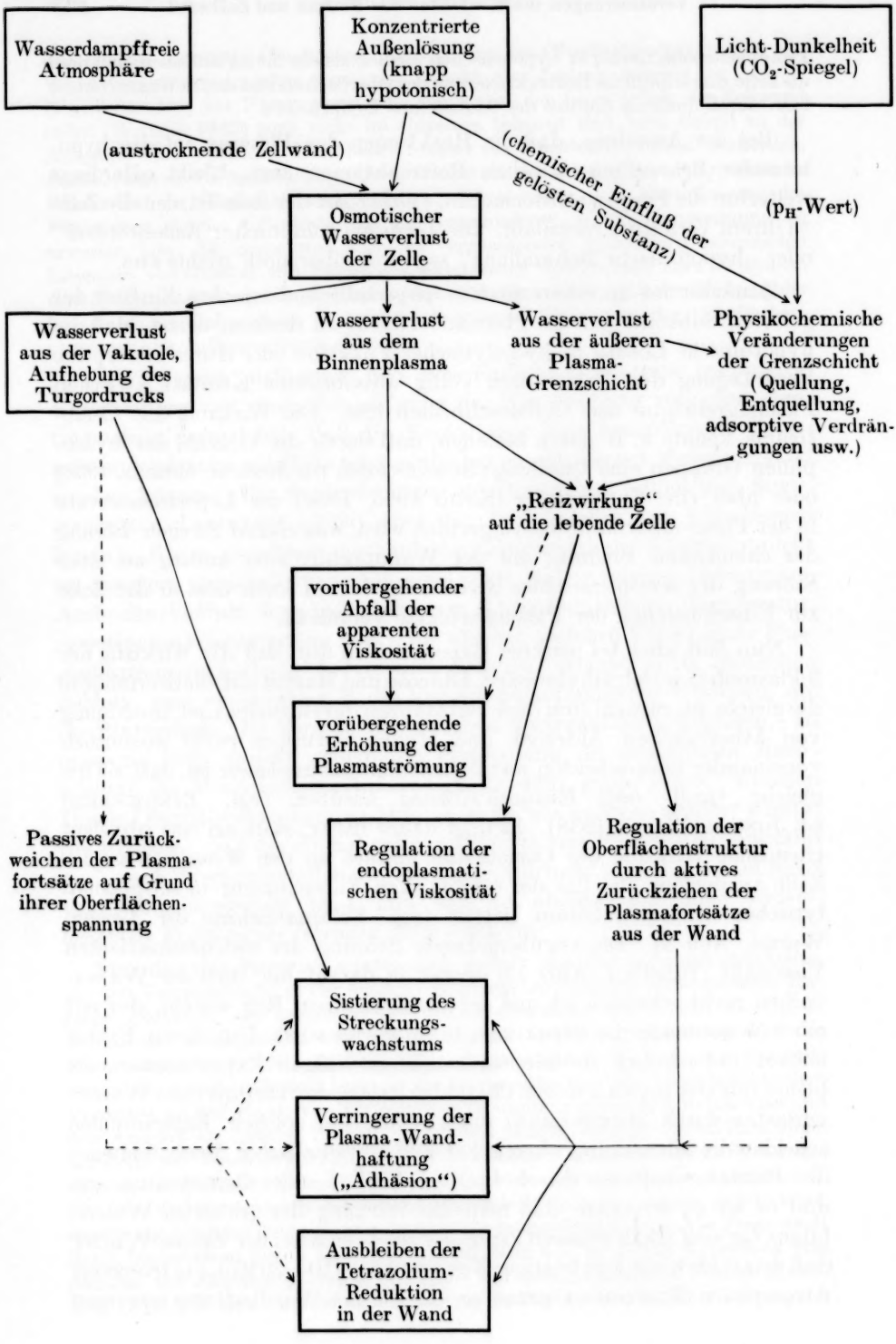
Eine derartige Folgerung scheint auch deshalb plausibel, weil sich gleichzeitig mit den Veränderungen in der äußeren Plasmagrenzschicht im Binnenplasma Vorgänge abspielen, die ausgesprochen vitalen Charakter tragen und als „Reizreaktionen" anzusprechen sind (Regulation der apparenten Viscosität und der Plasmaströmung, S. 429). Die bei solchen Reizreaktionen allgemein zu erwartende biologische Zweckmäßigkeit liegt bei der Konstanthaltung der endoplasmatischen Viscosität auf der Hand: von der Struktur des endoplasmatischen Reticulums und dem Angebot an „freiem Wasser" im Plasma hängen wichtige Lebensfunktionen der Zelle ab. Nach STÅLFELT (1949, 1957) besitzen Pflanzen zwecks Konstanthaltung der optimalen Viscosität sogar eigens „viscositätsregulierende Substanzen". Die Gestaltveränderungen der Plasma*außenschicht* hingegen lassen gegenwärtig solange die Struktur dieser Schicht noch so ungenügend bekannt ist, die Frage nach einem biologischen Zweck kaum zu. Im Hinblick auf die starke Koppelung von *Struktur* und *Flächenausdehnung* in mono- und mehrmolekularen Filmen (LANGMUIR 1939) ließe sich etwa die Einschmelzung der Plasmafortsätze (Verringerung der

Protoplastenoberfläche) in hypotonischen Medien als ein Mittel auffassen, mit dem die Zelle eine schädliche Destrukturierung des Oberflächenfilms durch Wasserverlust bzw. durch direkten Einfluß des Osmoticums kompensiert.

Bei der Annahme, daß die Reaktionen des Plasmas auf die hypotonische Behandlung wirklich Reizreaktionen sind, bleibt allerdings weiterhin die Frage zu untersuchen, *welcher Art* der Reiz ist, der die Zelle zu ihrem Verhalten veranlaßt. Die Termini „osmotischer Außeneinfluß" oder „hypotonische Behandlung" sagen darüber noch nichts aus.

Zunächst ist an einen *direkten physikalisch-chemischen* Einfluß der gelösten Substanz auf die Plasmaoberfläche zu denken, derart, daß die hypotonische Lösung in hydrolytischer Funktion oder durch adsorptive Verdrängung den bisher noch völlig unbekannten Kontakt zwischen Plasmagrenzzone und Cellulosefibrillen löst. Die Wirkung des Osmoticums könnte z. B. darin bestehen, daß durch die Vielzahl der hydrophilen Gruppen eine Quellung (Bungenberg de Jong u. Mitarb. 1938) oder aber eine Entquellung (Kaho 1955, 1956) der Lipoidcoacervate in der Plasmaoberfläche hervorgerufen wird, was einmal zu einer Lösung der chemischen Bindung mit der Wandtextur, zum andern zu einer Störung der semipermeablen Strukturen führen kann und so die Zelle zur Einschmelzung der Plasmafortsätze veranlaßt.

Nun fällt aber bei unseren Experimenten auf, daß die Wirkung der 3 Plasmolytica Polyäthylenoxyd, Glucose und Mannit auf die Grenzfläche die gleiche ist, obwohl sich diese Substanzen durch Besitz und Anordnung von Ätherbrücken, Aldehyd- und Hydroxylgruppen recht wesentlich voneinander unterscheiden und daher nicht anzunehmen ist, daß sie die gleiche Quell- oder Entquellwirkung ausüben (vgl. Bungenberg de Jong u. Mitarb. 1938). Es liegt daher näher, statt an eine physikochemische Wirkung des Osmoticums einfach an den *Wasserverlust* der Zelle zu denken, der bei der osmotischen Entspannung in subplasmolytischen Konzentrationen eintritt (vgl. Volumabnahme der *Lemna*-Wurzel, Abb. 3). Die vorübergehende Störung der endoplasmatischen Viscosität (Tabelle 1, Abb. 10) deutet ja darauf hin, daß der Wasserverlust recht erheblich ist und auf die Zelle einen Reiz ausübt, der mit einer Neuordnung der Strukturen beantwortet wird. Um diesen Faktor isoliert untersuchen zu können, wurde in einigen Experimenten, die bisher nur erst provisorischen Charakter haben, der Einfluß eines Wasserverlustes durch *Austrocknung* untersucht. Bei solchen Experimenten scheidet die Mitwirkung chemischer und physikalischer Veränderungen der Plasmagrenzfläche durch direkten Einfluß eines Osmoticums aus, und es ist zu erwarten, daß man die Wirkung der gestörten Wasserbilanz für sich allein erfassen kann. Es zeigte sich bei der *Lemna*-Wurzel, daß tatsächlich ein kurzfristiger Wasserentzug (10—30 Min.) in trockener Atmosphäre (Exsiccator) genau so die Plasma-Wandhaftung *verringert*


Wasserdampffreie Atmosphäre
Konzentrierte Außenlösung (knapp hypotonisch)
Licht-Dunkelheit (CO_2-Spiegel)
(austrocknende Zellwand)
(chemischer Einfluß der gelösten Substanz)
(p_H-Wert)
Osmotischer Wasserverlust der Zelle
Wasserverlust aus der Vakuole, Aufhebung des Turgordrucks
Wasserverlust aus dem Binnenplasma
Wasserverlust aus der äußeren Plasma-Grenzschicht
Physikochemische Veränderungen der Grenzschicht (Quellung, Entquellung, adsorptive Verdrängungen usw.)
„Reizwirkung" auf die lebende Zelle
vorübergehender Abfall der apparenten Viskosität
vorübergehende Erhöhung der Plasmaströmung
Passives Zurückweichen der Plasmafortsätze auf Grund ihrer Oberflächenspannung
Regulation der endoplasmatischen Viskosität
Regulation der Oberflächenstruktur durch aktives Zurückziehen der Plasmafortsätze aus der Wand
Sistierung des Streckungswachstums
Verringerung der Plasma-Wandhaftung („Adhäsion")
Ausbleiben der Tetrazolium-Reduktion in der Wand

wie ein Wasserverlust in osmotisch wirksamen Medien. Da hierbei keine Quellung, sondern höchstens eine *Entquellung* der Grenzschicht erfolgen kann, darf man mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, daß ein ähnlicher Prozeß auch bei dem Wasserentzug durch Lösungen stattfindet. Weitere Versuche dieser Art unter besonderer Berücksichtigung einer möglichen Viscositätsverringerung im gesamten Plasma, wie sie NORTHEN (1943) angibt, müssen folgen.

Die besprochenen Ergebnisse seien abschließend in Form einer schematischen Übersicht zusammengefaßt, in der die *experimentell gefundenen Daten umrandet* und die als wahrscheinlich zu bezeichnenden Intermediärwirkungen durch ausgezogene Pfeile dargestellt sind. Andere diskutable Effekte, die aber auf Grund der experimentellen Indizien als weniger wahrscheinlich anzusehen sind, sind durch gestrichelte Pfeile wiedergegeben.

Zusammenfassung

1. An der Wurzel von *Lemna minor* und Blättern von *Helodea densa* wird der Einfluß hypotonischer Medien auf die Plasma-Wandhaftung („Adhäsion") und andere physiologische Faktoren geprüft.

2. Der Begriff „Wandhaftung" wird präzisiert und mittels einer grenzplasmolytischen Methode in absoluten Einheiten ausgedrückt. Andere Möglichkeiten zur Bestimmung der Wandhaftung werden diskutiert.

3. Nach Vorbehandlung der Objekte in knapp hypotonischer Lösung ist bei anschließender Übertragung in hypertonisches Medium („fraktionierte Plasmolyse") eine Verringerung der Wandhaftung festzustellen.

4. Die Erniedrigung der Plasma-Wandhaftung im hypotonischen Medium erfolgt allmählich und beruht offensichtlich auf dem Rückzug von Plasmafortsätzen aus der Zellwand.

5. Es werden Gründe dafür angeführt, daß diese Erscheinung eine aktive Reaktion („Reizreaktion") der Zelle darstellt.

6. Gleichzeitig mit der Verringerung des mechanischen Kontaktes zwischen Plasma und Wand erfolgt eine Unterbrechung des Streckungswachstums.

7. Die Erniedrigung der Wandhaftung und die Hemmung des Streckungswachstums sind nicht voll reversibel.

8. Durch den osmotischen Wasserentzug im hypotonischen Medium wird bei *Helodea* die apparente Viscosität des Binnenplasmas vorübergehend erniedrigt und die Plasmaströmung stark erhöht. Beide Effekte klingen nach kurzer Zeit ohne äußeren Anlaß wieder ab.

9. Es werden Belege dafür angeführt, daß bei *Lemna* die Erniedrigung der Plasmolysezeit im Dunkeln auf einer generellen Zurückziehung von Plasmafortsätzen aus der Zellwand (Erniedrigung der Wandhaftung), die

starke Überhöhung im Licht dagegen auf einer unterschiedlichen Neudurchdringung, vor allem der wachsenden Wand, mit Plasma beruht („Mosaikwachstum").

Der experimentelle Abschluß dieser Arbeit wurde durch Herrn Prof. Dr. H. A. v. STOSCH, Marburg, ermöglicht, wofür Verf. ihm an dieser Stelle seinen besonderen Dank aussprechen möchte. Für Anregungen zur Diskussion sei Herrn Prof. Dr. H. J. BOGEN, Braunschweig, herzlich gedankt. Die experimentellen Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt.

Literatur

BENNETT, M. C., and Sir E. RIDEAL: Membrane behaviour in Nitella. Proc. roy. Soc. B **142**, 483—496 (1954). — BOGEN, H. J.: Untersuchungen über Hitzetod und Hitzeresistenz pflanzlicher Protoplaste. Planta (Berl.) **36**, 298—340 (1948). — BOGEN, H. J., u. G. FOLLMANN: Osmotische und nichtosmotische Stoffaufnahme bei Diatomeen. (Untersuchungen über die „spezifische Permeabilität" der Diatomeen.) Planta (Berl.) **45**, 125—146 (1955). — BUNGENBERG DE JONG, H. G., G. G. P. SAUBERT u. H. L. BOOY: Der Einfluß organischer Nichtelektrolyte auf Oleat- und Phosphatidkoazervate. V. Protoplasma (Wien) **30**, 1—38 (1938). — CURRIER, H. B., and W. VAN DER ZWEEP: Plasmolysis and the tetrazolium reaction in Anacharis canadensis. Protoplasma (Wien) **45**, 125—132 (1955). — DRAWERT, H.: Zur Frage der Plasmolyse geöffneter Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 401 bis 408 (1957). — FITTING, H.: Untersuchungen über die Aufnahme von Salzen in die lebende Zelle. Jb. wiss. Bot. **56**, 1—64 (1915). — FOLLMANN, G.: Über Kappenplasmolyse und Vakuolenkontraktion. II. Die Reizplasmolyse mariner Planktondiatomeen. Planta (Berl.) **48**, 393—417 (1957). — FREY-WYSSLING, A.: Physiology of cell wall growth. Ann. Rev. Plant Physiol. **1**, 169—182 (1950). — FREY-WYSSLING, A., K. MÜHLETHALER u. R. W. G. WYCKOFF: Mikrofibrillenbau der pflanzlichen Zellwände. Experientia (Basel) **4**, 475—476 (1948). — GÜNTHER, E.: Der Einfluß chemischer und physikalischer Faktoren auf die protoplasmatischen Eigenschaften isolierter Elodea-Blätter unter besonderer Berücksichtigung der Zusammenhänge zwischen Wachstumsphase und Plasmaviskosität. Protoplasma (Wien) **48**, 1—52 (1957). — HÖFLER, K.: Eine plasmolytisch-volumetrische Methode zur Bestimmung des osmotischen Wertes von Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. **35**, 706—726 (1917). — KAHO, H.: Untersuchungen über die antagonistische Wirkung von Mono- und Disacchariden und chemisch nahestehenden Stoffen bei der Wirkung einiger Elektrolyte auf das Pflanzenplasma. Protoplasma (Wien) **45**, 560—592 (1955). — Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der Mono- und Disaccharide sowie der mehrwertigen Alkohole bei der Wirkung von Säuren auf das Pflanzenplasma. Protoplasma (Wien) **47**, 164—188 (1956). — KESSLER, W., u. W. RUHLAND: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta (Berl.) **28**, 159—204 (1938). — LAMBERTZ, P.: Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermisaußenwänden. Planta (Berl.) **44**, 147—190 (1954). — LANGMUIR, J.: Pilgrim Trust Lecture. Molecular Layers. Proc. roy. Soc. A **170**, 1 (1939). — LUNDEGÅRDH, H.: The growth of root hairs. Ark. Bot. A **33**, 1—19 (1947). — MASUDA, Y.: Über den Einfluß von Auxin auf die Stoffpermeabilität des Protoplasmas III. Die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol auf die Harnstoffpermeabilität der Avena-Koleoptile. Bot. Mag., Tokyo **70**, 62—68 (1957). — MASUDA, Y., u. H. TAKADA: Bestimmung der Adhäsion in der Allium-Zelle bei Plasmolyse, besonders in den durch die Auxine vorbehandelten Zellen. Physiol. Plantarum (Cph.) **10**, 649—658 (1957). — MÜHLDORF, A.: Das plasmatische Wesen der pflanzlichen Zellbrücken. Beih. bot. Zbl. **56**, 171—364

(1937). — Mühlethaler, K.: Elektronenoptische Untersuchungen an pflanzlichen Geweben. Z. Zellforsch. **38**, 299—327 (1953). — Mühlethaler, K., u. H. F. Linskens: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pollenschläuchen. Experientia (Basel) **12**, 253—254 (1956). — Northen, H. T.: Relationship of dissociation of cellular proteins by incipient drought to physiological processes. Bot. Gaz. **104**, 480—485 (1943). — Pirson, A., u. G. Schaefer: Osmotischer Wasserentzug und Plasmolyse mit Polyäthylenoxyd. Protoplasma (Wien) **48**, 215—220 (1957). — Pirson, A., u. F. Seidel: Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von Lemna minor L. unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Kalziummangel. Planta (Berl.) **38**, 431—473 (1950). — Ruhland, W., H. Ullrich u. S. Endo: Untersuchungen zu den „spezifischen Permeabilitätsreihen" Höflers. I. Zur Frage der Alkoholpermeabilität von Pflanzenzellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Planta (Berl.) **27**, 650—668 (1938). — Scarth, G. W.: Adhesion of protoplasm to cell wall and the agents which cause it. Proc. Trans. roy. Soc. Canad. **17**, 137—143 (1923). — Scarth, G. W., and J. Levitt: The frost-hardening mechanism of plant cells. Plant Physiol. **12**, 51—78 (1937). — Schaefer, G.: Ein Versuch zur quantitativen Auswertung der Plasmolyseform- und -zeitmethode. Protoplasma (Wien) **44**, 422—436 (1955). — Über die Wirkung von Stoffwechselfaktoren auf den Plasma-Wand-Kontakt in der Wurzel von Lemna minor L. Flora (Jena) **143**, 327—355 (1956). — Schumacher, W., u. P. Lambertz: Über die Beziehungen zwischen der Stoffaufnahme durch Blattepidermen und der Zahl der Plasmodesmen in den Außenwänden. Planta (Berl.) **47**, 47—52 (1956). — Sitte, P.: Der Feinbau verkorkter Zellwände. Mikroskopie **10**, 178—200 (1955). — Stålfelt, M. G.: The lability of the protoplasmic viscosity. Physiol. Plantarum (Cph.) **2**, 341—349 (1949). — The influence of distilled water on the fluidity of protoplasm. Protoplasma (Wien) **48**, 134—142 (1957). — Stocker, O., u. H. Ross: Reaktions- und Restitutionsphase der Plasmaviskosität bei Dürre- und Schüttelreizen. Naturwissenschaften **43**, 283 (1956). — Strasburger, E.: Über Plasmaverbindungen pflanzlicher Zellen. Jb. wiss. Bot. **36**, 493—610 (1901). — Throneberry, G. O., and F. G. Smith: The effect of triphenyltetrazolium chloride on oat embryo respiration. Science **117**, 13—15 (1953). — Virgin, H. I.: The effect of light on the protoplasmic viscosity. Physiol. Plantarum (Cph.) **4**, 255—357. (1951). — Wartenberg, A.: Plasmolyseversuche an geöffneten Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 263—274 (1957). — Weber, F.: Krampfplasmolyse bei Spirogyra. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **206**, 629—634 (1924). — Wergin, W.: Über den Feinbau der Zellwände höherer Pflanzen. Biol. Zbl. **63**, 350—370 (1943).

Dr. G. Schaefer,
Botanisches Institut der Universität, Marburg a. d. Lahn, Pilgrimstein 4

Planta, Bd. 51, S. 440—480 (1958)

Aus der Lehr- und Forschungsanstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau, Geisenheim a. Rh.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS ALLELOPATHISCHER ERSCHEINUNGEN BEI EINIGEN JUGLANDACEEN

Von

HANS ROBERT BODE

Mit 17 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Januar 1958)

Einleitung

Walnußbäumen wird die Eigenart zugesprochen, auf das Gedeihen anderer Pflanzen nachteilig einzuwirken. Diese Erscheinung ist ursächlich in Verbindung mit dem Juglon, einem in den Organen der Nußbäume vorkommenden α-Naphtochinonderivat, gebracht worden. Unter den vielen diesbezüglichen Angaben über allelopathische Wirkungen bei den Juglandaceen (vgl. GRÜMMER 1955. S. 57) interessieren hier besonders diejenigen, die Ansätze zur experimentellen Klärung enthalten. M. T. COOK (1921) berichtete über ein Kümmern und Welken von Tomaten und Kartoffelpflanzen in der Nähe von Schwarznußbäumen *(Juglans nigra)*. Aus den Beobachtungen, die er an Freilandversuchen gewonnen hatte, schloß er, daß zum Zustandekommen des Welkens der Tomatenpflanzen ein unmittelbarer Wurzelkontakt mit den Wurzeln der Schwarznuß Voraussetzung sei. MASSEY (1925) setzte Wasserkulturen von Tomaten Stücke der Wurzelrinde von Schwarznüssen zu und beobachtete schon nach 48 Stunden ein Welken der Versuchspflanzen, das mit einer Bräunung der Wurzel einherging. Als den in Frage kommenden toxisch wirkenden Stoff des Rindenauszuges sprach er das Juglon an. „It is likely, that juglone or a similar substance is the toxic constituent of the walnut" (MASSEY 1925, S. 783). Die Bestätigung für die Richtigkeit dieser Annahme glaubte DAVIS (1928) dadurch erbracht zu haben, daß es ihm gelungen war, durch synthetisches Juglon an Tomaten und Luzernepflanzen ähnliche Symptome und Verfallserscheinungen zu erzeugen, wie sie MASSEY zuvor durch die Beigabe der Rinde von Schwarznüssen beobachtet hatte. Die Frage, ob und auf welchem Wege der toxische Stoff aus den Nußbäumen austritt, bleibt bei den Arbeiten von MASSEY und DAVIS noch offen. Lediglich die Beobachtung, daß er unter gewelkten Tomaten stets auf Tagwurzeln des Nußbaumes gestoßen war, brachte COOK zu der Ansicht, daß ein Wurzelkontakt zwischen Nußbaum und Tomatenpflanze für die Übertragung des toxischen Stoffes notwendig sei. Will man

hier weiter vordringen, so ist es unerläßlich, alle Wege, auf denen der allelopathisch wirksame Stoff den Nußbaum natürlicherweise verlassen kann, zu untersuchen. Als Zuführungswege kommen in Frage:

1. Eine Abgabe durch die Blätter des Nußbaumes. Die Ableitung geschieht mit der Regentraufe. Hierbei gelangt der wirksame Stoff entweder auf die oberirdischen Teile oder an die Wurzel der darunter stehenden Bodenpflanze.

2. Die von der Wurzel des Nußbaumes ausgeschiedenen Stoffe werden im Bodenwasser gelöst oder kommen durch unmittelbaren Kontakt von Wurzel zu Wurzel zur Wirkung.

3. Die vom Nußbaum jahresperiodisch abgestoßenen Organe, die männlichen Kätzchen, die grünen Schalen des Perikarps und der herbstliche Laubfall führen direkt oder bei ihrer Verrottung die schädlichen Körper dem Boden zu.

Die Versuche

a) Gefäßversuche im Freiland. Eine grobe Sichtung der Verhältnisse, ob die Regentraufe oder die Wurzelausscheidungen des Nußbaumes an dem Zustandekommen der Schädigung der mit ihm zusammenwachsenden Tomatenpflanzen beteiligt sind, gelingt mit Mischkulturen von Jungpflanzen beider Partner in Gefäßversuchen.

Zweijährige Bäumchen von *Juglans nigra* wurden im Vorfrühling in großen Mitscherlichgefäßen in ein Gemisch von Lehm und Komposterde gepflanzt. Die Gefäße standen auf einem Lattenrost im Freien und waren Sonne und Regen ungehindert ausgesetzt. Die etwa 40 cm hohen Bäumchen trieben gut durch und entwickelten reichlich Laubblätter. Drei Monate danach wurden in jedes Gefäß zwei, vorher in Töpfen angezogene, gleich starke Tomatenpflanzen gesetzt. Die Tomatenpflanzen standen so, daß bei jedem Regen die Traufe der Schwarznußbäumchen ihre Blätter benetzten, sie selbst aber unbeschattet waren und genügend Spielraum für ihre Entfaltung hatten. Gleich große Tomaten standen als Kontrolle unter denselben Bedingungen gleichfalls in Mitscherlichgefäßen.

Schon nach dem ersten Regen zeigten die mit Schwarznüssen zusammengepflanzten Tomaten eine deutliche Epinastie ihrer Blätter. Diese Erscheinung verstärkt sich nach weiteren Regenfällen bis zu einer Einrollung der Blattmittelrippe (vgl. Abb. 1). Während die Kontrollpflanzen wohlausgebildete Blattspreiten aufwiesen, waren die der Versuchspflanzen erheblich zurückgeblieben. Von der dritten Woche an vergilbten von der Basis her erst die Kotyledonen und kurze Zeit darauf die ersten drei Folgeblätter. Während die Kontrollpflanzen kein einziges vergilbtes Blatt aufwiesen, welkten sie schließlich ab und wurden abgestoßen. Bei der Größe der für die Kultur gewählten Gefäße (24×22 cm Innenmaße) ist es unwahrscheinlich, daß eine Verarmung des Bodens an Nährstoffen durch die zweifache Inanspruchnahme der Mischkultur (Schwarznuß und Tomate) diese Vergilbung herbeigeführt haben könnte. Auch Unterschiede in der Bodenfeuchtigkeit zwischen

den beiden Gefäßgruppen können nicht als Ursache des Vergilbens angesprochen werden, da die Kulturen bei Ausbleiben des Regens mit der Brause gegossen wurden.

b) Gefäßversuche unter Glas. Wie verhalten sich Schwarznuß und Tomaten zueinander, wenn durch ein schützendes Glasdach die Regentraufe der Schwarznuß unterbunden wird?

Um dies zu klären, kamen zehn der im Frühjahr in Mitscherlichgefäße eingetopften Schwarznußbäumchen Ende April in ein Versuchsgewächshaus. Nach-

Abb. 1. Epinastie der Blätter als Folge der Einwirkung von *Juglans nigra*. Rechts: Sproß einer Tomatenpflanze, die der Regentraufe von *Juglans nigra* ausgesetzt war; links: Sproß einer Kontrollpflanze

dem die Bäume angewurzelt waren, was sich an ihrer guten Trieb- und Laubentwicklung unschwer feststellen ließ, wurden auch hier je zwei Tomatensämlinge zu jeder Schwarznuß in das Gefäß gepflanzt. Eine gleich große Anzahl von Tomaten wurde in entsprechenden Mitscherlichgefäßen, die mit der gleichen Erdemischung beschickt worden waren, als Kontrollpflanzen eingesetzt. Beide Partner erhielten ihr Gießwasser stets nur unmittelbar an die Wurzel gegossen, so daß die oberirdischen Teile der Pflanzen während der Versuchszeit trocken blieben. (Mit Ausnahme der Guttationstropfen der Tomaten).

Der Unterschied im Aufwuchs dieser Tomatenpflanzen, verglichen mit denen, die im Freiland unter dauernder Einwirkung der Regentraufe der Schwarznußbäumchen gestanden hatten, war verblüffend. Bei der unter Glas gezogenen Versuchsserie verhielten sich Versuchs- und Kontrollpflanzen zuerst gleich. Im weiteren Verlauf waren die Tomaten in der Mischkultur mit Schwarznuß den Kontrollpflanzen in der Entwicklung voraus und zeigten einen früheren Blühtermin. Bei

der Gegenüberstellung des Verhaltens der Pflanzen beider Versuchsserien kommen wir zu folgendem Ergebnis:

1. Tomatensämlinge, die in gewöhnlicher Erde wurzeln und während ihres Aufwuchses der Regentraufe der Schwarznuß ausgesetzt waren, zeigten eine schwächere Gesamtentwicklung, starke Epinastie der Blätter und ein frühzeitiges Vergilben der basalen Blätter.

2. In derselben Mischkultur Schwarznuß—Tomate wachsen die Tomaten nicht nur normal, sondern sind sogar gegenüber den Kontrollpflanzen im Vorsprung, wenn durch ein schützendes Glasdach die Regentraufenbildung unterbunden wird. Dieser Befund spricht sicherlich nicht für die Annahme des Vorhandenseins einer toxischen Wurzelausscheidung. Da zu den Versuchen jedoch frische Komposterde genommen worden war, könnte es sein, daß die ihr innewohnende große Absorptionskraft eventuelle Wurzelausscheidungen nicht zur Geltung kommen ließ. Unverständlich bleibt bei dieser Annahme der Wachstumsvorsprung der Tomaten in der Mischkultur gegenüber den Kontrollpflanzen. Wir werden den Versuch in einem Nährmedium wiederholen, dessen absorptive Fähigkeiten gering sind.

c) Nährlösungskulturen in Quarzsand. Für das Anlegen einer Mischkultur in Quarzsandkulturen zwischen Schwarznuß und Tomate waren Saatnüsse von *Juglans nigra* zwecks Stratifizierung über Winter bei niedrigen Temperaturen (+3 bis +8 Grad C) in feuchten Sand gebettet worden. Im März wurden die Saatkästen in ein geheiztes Gewächshaus überführt. Sowie der Keimsproß des Sämlings die oberste Sanddecke durchbrochen hatte, wurde der Sämling vorsichtig herausgehoben und die fleischige Pfahlwurzel, deren oberer Teil einen Kranz von Seitenwurzeln bereits aufwies, durch Abspülen von anhaftendem Sand befreit. In diesem Stadium hängt die Saatnuß, deren beide Keimblätter in den klaffenden beiden Schalenhälften verborgen liegen, mit dem Keimling wie durch eine Klammer durch die Basis der in den Sproß mündenden Keimblätter zusammen. Hierauf wurden sie einzeln in Mitscherlichgefäße in gereinigten Quarzsand gebracht und mit v. d. Cronescher Nährlösung, der Hoaglands A-Z-Lösung zugesetzt worden war, eingeschlemmt. Unter diesen Verhältnissen wachsen die Sämlinge schnell heran, so daß sie nach sechs Wochen eine Höhe von 35 cm erreichten und 6—7 Blätter aufweisen konnten. Die Verwendung von Nährlösung ohne die Einbettung der Pfahlwurzel in Quarzsand empfiehlt sich nicht, da sowohl die Pfahlwurzel, wie auch die Seitenwurzeln bei unwillkürlichen Stößen wie Glas brechen.

In jeden Schwarznußtopf wurden drei Tomatensämlinge derart gepflanzt, daß sie in der Mitte zwischen Gefäßrand und dem Schwarznußstämmchen standen. Die Tomatenpflänzchen hatten etwa Pikiergröße, also ein Folgeblatt außer den Keimblättern entwickelt.

Die Tomaten zeigten solange, bis sich ihr Wurzelsystem stärker zu entwickeln begann, keine Wachstumsunterschiede gegenüber den Kontrollpflanzen (Abb. 2). Sowie dieses Stadium erreicht war, machte sich der fördernde Einfluß der Schwarznuß auf das Wachstum der Tomaten stärker geltend, als dies in den Mischkulturen in gewöhnlicher Erde der Fall gewesen war. Die Tomate bildet in Quarzsandkulturen, die in

Mitscherlichgefäßen durchgeführt werden, einen dichten oberflächlichen Wurzelteller, von dem einzelne Wurzeln bis auf den Gefäßgrund durchstoßen. Diese letzteren durchwachsen hierbei die Zone der filigranartig um die Pfahlwurzel herumstehenden Saugwurzeln der Schwarznuß. Durch Augenschein kann man sich davon überzeugen, daß in einem späteren Stadium die Tomatenwurzeln der oberen Zone die Schalenhälften der Saatnuß umspinnen und sich als dichter Wurzelfilz in den beiden Schalenhälften der Saatnuß in den inzwischen von dem Schwarznußsämling ausgesogenen Kotyledonlappen ansiedeln. Diese chemo-

Abb. 2. Quarzsandkultur von Schwarznuß und Tomaten in einem Gefäß (rechts); links, Kontrollpflanzen

tropisch zu erklärende Erscheinung darf aber nicht so aufgefaßt werden, als ob von seiten der Tomatenwurzel nun ein Kontaktsuchen gegenüber den Schwarznußwurzeln vorläge. Weder ein Kontaktsuchen noch ein Ausweichen der gegenseitigen Wurzeln der Partner kann festgestellt werden. Hierüber belehrte ein Versuch in einem Wurzelkasten mit schräg gestellter Glasplatte, bei dem in einer Quarzsandkultur in der Mitte der Scheibe ein Schwarznußsämling und unmittelbar neben ihm zu beiden Seiten ein Tomatenpflänzchen wuchsen. Die Tomatenwurzeln, die von den Schwarznußwurzeln leicht zu unterscheiden waren, zeigten beim Passieren der Seitenwurzelzone der Schwarznuß in dem Verlauf ihrer Wurzeln keine Anzeichen für eine einseitige Beeinflussung. Wenn also ein naher Wurzelkontakt zu der Übertragung einer angenommenen toxischen Wurzelausscheidung führen würde (COOK 1921), so hätte das in den oben geschilderten Quarzsandkulturen zwischen Schwarznuß und Tomate, die ganze vier Monate in demselben Gefäß zusammen aufwuchsen, doch in Erscheinung treten müssen. Die Tomaten in der

Mischkultur kamen bei früherer Entwicklung auch etwas früher zur Blüte. Sie überwucherten hierbei das Schwarznußbäumchen und erreichten wie die Kontrollpflanzen vor der Ernte der Früchte eine Höhe von über 80 cm.

Die Wirkung des Nährlösungsfiltrates von Schwarznußsämlingen auf das Wachstum von Tomatenpflanzen

In der folgenden Versuchsserie wurden Tomatenpflänzchen nur mit einem Nährlösungsfiltrat gegossen, daß aus Quarzsandkulturen von Schwarznußsämlingen stammte. Die dazugehörigen Kontrollpflanzen

Abb. 3. Aufzucht von Tomatenpflanzen in Nährlösungen, in denen vorher Schwarznußsämlinge herangewachsen waren: Schale rechts und links; Mitte Kontrollpflanzen

bekamen die hierfür verwendete v. d. Cronesche Nährlösung + A-Z-Lösung in frischem Zustande. Wiederum trat ein deutlicher Wachstumsvorsprung der mit dem Nährlösungsfiltrat der Schwarznußbäumchen begossenen Tomatenpflanzen zutage. Tabelle 1 zeigt die Unter-

Tabelle 1. *Tomatenversuch mit Nährlösungsfiltrat von Schwarznußsämlingen* Versuch 71, angesetzt 3. 4. 57, beendet 22. 5. 57. Werte von je 10 Versuchspflanzen.

	Insgesamt	Blätter	Stengel	
Frischgewicht in g				
Kontrollpflanzen	175,6	101,2	74,40	100%
J. N. Nährlösungsfiltrat	229,94	134,4	95,54	130%
Trockengewicht in g				
Kontrollpflanzen	25,50	15,60	9,90	100%
J. N. Nährlösungsfiltrat	35,20	22,00	13,20	138%

schiede im Frisch- und Trockengewicht zwischen Tomatenpflanzen, die mit Nährlösungsfiltrat groß gezogen worden sind, und ihren Kontrollpflanzen (Abb. 3). Daß ein längerer Aufenthalt *unverletzter Schwarznuß-*

wurzeln in einer Nährlösung *keine für das Gedeihen von Tomaten schädliche* Stoffe zurückläßt, zeigt in anschaulicher Weise ein Vergleich der Wurzelausbildung der Pflanzen beider Versuchsreihen (vgl. Abb. 4). Es sei denn, daß die hier stimulierend wirkenden Stoffe in höherer Konzentration eine andere Wirkung auf das Tomatenwachstum hervorzurufen imstande wären (vgl. S. 478).

Bei der Wiederholung der Versuche zeigt sich, daß diese Überlegenheit in der Substanzbildung bei der Ernährung mit Nährlösungsfiltrat

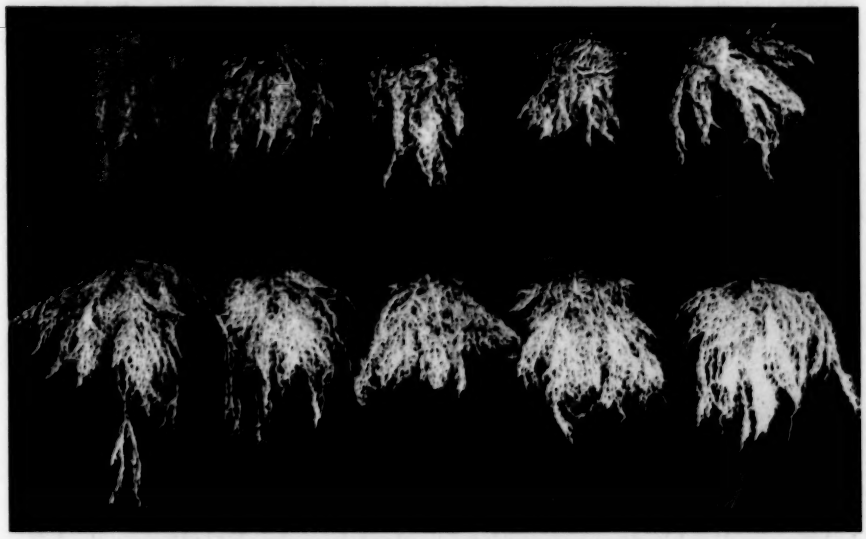


Abb. 4. Wurzelentwicklung von Tomaten, die in Nährlösungsfiltraten der Schwarznuß herangewachsen sind. Obere Reihe: Wurzeln der Kontrollpflanzen. Untere Reihe: Wurzeln von Tomatenpflanzen, die in Nährlösungen kultiviert worden sind, in denen zuvor Schwarznußsämlinge gewachsen waren

mit dem Alter der Sämlinge bzw. ihres Wurzelsystems nicht abnimmt. Blindfiltrate, bei denen in Quarzsandgefäßen abgestandene Nährlösung als Filtrat benutzt wurde, hatten keinerlei fördernde Wirkung auf das Wachstum von Tomatensämlingen.

Ob es sich bei dieser Erscheinung um Wurzelausscheidungen der Schwarznuß oder eine bakterielle Tätigkeit handelt, konnte noch nicht entschieden werden. Die sterile Aufzucht von Nußembryonen dürfte bei ihrer großen Empfindlichkeit schwierig sein.

Wir fassen zusammen:

1. Die Mischkultur von Schwarznuß und Tomate zeigt — die Unterbindung der Traufebildung vorausgesetzt — in Quarzsandkulturen mit v. d. Cronescher Nährlösung unter Zusatz von A-Z-Lösung bei der Tomate *keine* Schädigung, sondern eine deutliche *Wachstumsförderung durch die Schwarznuß als Partner.*

2. Benutzt man die *Nährlösung, in der Schwarznußsämlinge* in Quarzsandkulturen gestanden haben, zur Aufzucht von Tomatensämlingen in gesonderten Quarzsandgefäßen, so tritt auch hier die *wachstumsfördernde* Wirkung in Erscheinung.

Auch dieses Ergebnis steht in offenbarem Widerspruch zu der Annahme Cooks, daß der Wurzelkontakt zwischen Schwarznuß und Tomate erst die Übertragung des Juglons oder eines verwandten Körpers herbeiführt, und damit die Schädigung der Tomatenpflanze in die Wege leitet. In diesem Zusammenhange darf darauf hingewiesen werden, daß es bisher nie gelungen ist, in einem Nährlösungsfiltrat, das von Schwarznußsämlingen herstammt, durch eine Ausschüttelung mit Chloroform auch nur Spuren von Juglon nachzuweisen — wenn es zu keiner Traufenbildung gekommen war. — Es bleibt noch die Frage zu klären, ob das Juglon bei einer eventuellen Ausscheidung durch die Wurzeloberfläche nicht von der Nährlösung sofort chemisch gebunden worden ist. Setzen wir einer filtrierten, klaren v. d. Croneschen Nährlösung eine bestimmte Menge Juglon zu, so verändert sie seine Menge nicht.

Die Feststellung des Ausbleibens der Juglonabsonderung durch die Wurzel der Schwarznußsämlinge in die Nährlösung hinein lenkt unseren Blick auf das anatomische Bild der Nußwurzel und die in ihm zu beobachtende Verteilung des Juglons, das in der unverletzten Zelle als Dihydrojuglon-5-glucosid vorhanden ist (Daglish 1948). Das Dihydrojuglon hat keine Eigenfärbung. Kommt es dagegen außerhalb der Zelle mit dem Sauerstoff der Luft in Berührung, so wird es erst gelb, dann braun verfärbt. Das Dihydrojuglon ist hierbei zu Juglon oxydiert worden. Auf einem frischen Querschnitt durch die fleischige Pfahlwurzel oder auch eine der Seitenwurzeln ist nach wenigen Augenblicken die Gelbbraunfärbung des Zentralzylinders schon makroskopisch sichtbar. — Die Seitenwurzeln haben ein pentarch bis heptarches Leitbündel. Die Hauptorte der Juglonfärbung finden wir in den Vacuolen der Endodermis, des Pericykels und der beiden auf ihn nach innen folgenden Zellreihen. Stets stellt die Endodermis die äußere Begrenzung der gefärbten Zone nach außen hin dar. In der zwölf bis sechzehn Zellschichten umfassenden Wurzelrinde ist das Juglon auf jeden Fall nicht in so großen Mengen vorhanden, daß man mit den landläufigen Juglonnachweisen, Rotfärbung durch Kalilauge oder Ammoniak, eine Reaktion zustande bringen kann. Wohl weisen die Zellen der Wurzelrinde häufig Gerbstoffvacuolen auf. Die abschließende Wurzelepidermis besteht aus kleinen flachen Zellen mit geringer Wurzelhaarbildung. Die Wurzelrinde ist verhältnismäßig kurzlebig und wird durch ein im Pericykel entstehendes Abschlußgewebe zum Absterben gebracht. Der negative Befund der Juglonabsonderung der Schwarznußwurzel in Nährlösungen und die im mikroskopischen Bild der Wurzel zu beobachtende Verteilung des Dihydrojuglon stehen also miteinander im Einklang.

Der Einfluß abgestoßener Organe von Schwarz- und Walnuß auf das Wachstum der Tomate

Dreimal im Jahr wirft der Nußbaum Teile seiner Organe ab, die männlichen Kätzchen nach dem Verblühen im Frühjahr, die grünen Schalen der Perikarpien sowie das Laub im Herbst. Auf diesem Wege kommen beträchtliche Substanzmengen an Gerbstoffen und α-Naphtochinon-Abkömmlingen auf die unter dem Baum wachsenden Pflanzen, und bei der Verrottung dieser abgeworfenen Organe werden die Stoffe unmittelbar oder in veränderter Form dem Erdreich zugeführt. Wir werden hierbei zu unterscheiden haben zwischen einer primären Wirkung der frischen Organe und der Anreicherung bestimmter für das Wachstum der Tomate ungünstiger Verbindungen bei der Verrottung im Boden[1].

Die Gewebe der männlichen Kätzchen aller Walnußarten sind reich an Dihydrojuglon (4—6% des Frischgewichtes). Das vom Baum abgeworfene Kätzchen verliert in der trockenen, warmen Sommerluft in kurzer Zeit sein Gewebewasser und wird lufttrocken. Wenige Tage nach dem Abwurf ist aus dem lufttrockenen Kätzchen kein freies Juglon mehr zu extrahieren. — Auch die Menge des verstäubenden Pollens darf in ihrer Wirkungsmöglichkeit auf andere Pflanzen nicht übersehen werden.

So ergaben 100 g frische Walnußkätzchen, im Labor zum Trocknen ausgelegt, 2,690 g goldgelben Pollen. Schüttelt man 1 g Walnußpollen in 100 cm^3 Regenwasser, so weist die abfiltrierte Lösung einen Gerbstoffgehalt von 19,2 mg im Liter auf. Sie enthält aber kein freies Juglon. — Um eine Vorstellung von der Größenordnung der abgeworfenen Kätzchenmenge eines Nußbaumes zu erhalten, wurden unter der Krone eines etwa sechzigjährigen Baumes von *Juglans regia* auf einem abgesteckten Quadrat von 4 × 4 m die abgefallenen Kätzchen gesammelt. Die eingesammelte Kätzchenmenge hatte ein Gewicht von 1,580 kg. Die von der Krone des Nußbaumes bestreute Fläche betrug 78 m^2, so daß sich für den ganzen Baum eine abgeworfene Kätzchenmenge von abgerundet 7,5 kg ergab.

Wie wirkt sich diese von oben herabkommende „Gründüngung" auf das Gedeihen darunterstehender Tomaten aus?

Von einem etwa achtzigjährigen großen Geisenheimer Schwarznußbaum standen reichliche Mengen von abgefallenen Kätzchen zur Verfügung. Die zum Versuch verwendeten, drei Wochen alten Tomatenpflänzchen waren auf Gleichheit ihrer Größe und Wüchsigkeit aus einer größeren Anzucht der Sorte „Haubners Vollendung" herausgesucht worden. Die Sämlinge wurden zum Versuch in größere Töpfe umgetopft. Hierbei bekam die eine Serie eine Komposterde, der pro Topf 15 g Kätzchen — das ist noch keine Hand voll — zugesetzt worden waren. Bei der anderen Serie, die als Kontrollpflanzen fungieren sollten, unterblieb die Beimischung.

Der Versuch wurde am 31. Mai 1957 im Versuchsgewächshaus angesetzt. Nach einer Woche waren unter den günstigen Wachstums-

[1] Eine Übersicht der zahlreichen Arbeiten, die zur Klärung der Frage der im Boden zur Wirkung kommenden „Hemmstoffe" (Koline) pflanzlicher Herkunft in neuester Zeit beigetragen haben, findet sich bei RADEMACHER (1957).

bedingungen die Kontrollpflanzen schon doppelt so hoch, wie die im Wachstum zurückbleibenden Tomaten, deren Erde die Schwarznußkätzchen beigemischt worden waren. Die jeweiligen Entwicklungsstadien wurden photographisch festgehalten. Die weiteste Distanz in der Größe zwischen beiden Gruppen war am 12. Tage nach Versuchsbeginn festzustellen (Abb. 5). Während die Kontrollpflanzen von vollkommen gleicher Höhe und Ausbildung der Blätter blieben, waren die etwa halb so großen Pflanzen in den „Kätzchentöpfen" ungleich entwickelt. Ihre gering entfalteten Blattspreiten hatten einen blaustichigen

Abb. 5. Einwirkung abgeworfener Kätzchen der Schwarznuß auf das Wachstum von Tomaten. Rechts: Kontrollpflanzen in Komposterde; links: Tomaten, die unter Beimischung abgeworfener Kätzchen von *Juglans nigra* heranwachsen. Eine Woche nach Versuchsbeginn. (Depressionsphase)

Farbton und bildeten in den Epidermen der Blattunterseite Anthocyan aus. Die Kotyledonen wurden gelb, welkten und fielen ab. Eine Untersuchung des Zustandes der Wurzeln ergab, daß die in unmittelbarer Nähe der Kätzchen verlaufenden Wurzeln braungelbe Flecken der Wurzelrinde aufwiesen. An einzelnen Faserwurzeln waren die Streckungszonen kollabiert. Am Übergang des Hypokotyls zum Wurzelhals traten Rindenschwellungen auf, aus denen ein Kranz von Adventivwurzeln hervorbrach.

In dem Maße, als die der Erde beigegebenen Kätzchen sich durch bakterielle Tätigkeit zersetzten, veränderte sich das Bild. Die bei der Verrottung freiwerdenden Substanzen wirken von diesem Zeitpunkt an anscheinend als Gründünger, auf jeden Fall setzte nunmehr bei den „Kätzchentöpfen" eine ungemein schnelle Entwicklung ein, die bereits am 24. Juni zu der in Abb. 6 festgehaltenen fast gleichen Entwicklung zwischen Versuchs- und Kontrollpflanzen führte. Merkwürdig ist die ungemein schnelle Überwindung der zuvor so deutlich in Erscheinung getretenen Wachstumshemmung. Eine den ganzen Organismus irgendwie sichtbar schädigende Nachwirkung war nicht festzustellen.

Das frisch abgefallene Schwarznußkätzchen, wie auch das lufttrockene, enthalten ein oder mehrere Stoffe, die auf das Wachstum der Tomate stark hemmend einwirken. Im Boden sind diese Hemmstoffe aber einer alsbaldigen Zersetzung ausgesetzt.

Daß im lufttrockenen Zustand diese Eigenschaft des Schwarznußkätzchens nicht verlorengeht, zeigt ein Versuch, der mit dem gleichen Kätzchenmaterial vier Monate später angesetzt wurde und sich in nichts in seinem Ablauf von dem ersten unterscheidet. Der Versuch wurde insofern variiert, als dritte Gruppe Tomaten mit einem

Abb. 6. Die Tomatenpflanzen der Abb. 5 nach weiteren vierzehn Tagen. Rechts: „Kätzchenpflanzen"; links: gleich alte Kontrollpflanzen

abgekochten Kätzchenauszug gegossen wurden. Die Beigabe wirkte als Düngung und wies sich in vermehrtem Frisch- und Trockengewicht dieser Tomatenpflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen aus. Hieraus darf wohl geschlossen werden, daß der oder die Hemmstoffe thermolabil sind. Außer der Tomate wurde auch mit Tabak als Testpflanze für die von den Juglans-Arten ausgehenden allelopathischen Wirkungen gearbeitet. Über das Verhalten der Tabakpflanzen wird zusammenhängend an anderer Stelle berichtet werden. Dessen ungeachtet sollen die entsprechenden „Kätzchenversuche" mit einem Maryland Tabak hier Erwähnung finden. Auch beim Tabak beobachteten wir nach Zugabe von Schwarznußkätzchen zur Topferde eine schnell sichtbar werdende Wachstumsdepression gegenüber den gleich alten Kontrollpflanzen (Abb. 7). Der hemmenden Phase folgt auch hier eine stark fördernde, in der die durch Verrottung von Hemmstoffen befreite Kätzchensubstanz als Gründünger auf die Pflanzen einwirkt. Abweichend von dem Verhalten der Tomatenpflanzen werden bei den Tabakversuchen die Kontrollpflanzen in der zweiten Phase schnell von den „Kätzchenpflanzen" im Wachstum überholt. Eine eigenartige

Erscheinung trat hierbei zutage. Die „Kätzchenpflanzen" zeigten jeden Mittag während mehrerer Stunden ein Welken, welches bei den in diesem Stadium kleineren Kontrollpflanzen nicht zu beobachten war. Leidet die Beobachtung allelopathischer Vorgänge in der Natur häufig unter der Länge der Zeitspanne, bis sie für unser Auge sichtbar werden, so sind diese „Kätzchenversuche" mit ihren kurz hintereinander folgenden Hemmungs- und Förderungsphasen des Wachstums ein äußerst anschauliches Beispiel für allelopathische Vorgänge.

Abb. 7. Junge Tabakpflanzen, denen abgeworfene Kätzchen der Schwarznuß zur Topferde beigegeben worden sind. Eine Woche nach Versuchsbeginn. (Depressionsphase)

Die Wirkung des vergilbten Laubblattes der Juglans-Arten auf das Wachstum der Tomate

Es ist bekannt, daß das getrocknete Walnußblatt als Droge keinen nennenswerten Gehalt an Juglon mehr aufweist (Wasicky 1936, S. 46). Das besagt nun aber nicht, daß die abgetrockneten Blätter im Herbst nicht Stoffe enthalten, die anfangs auf das Wachstum der Tomaten ähnlich hemmend wirken wie das lufttrockene Kätzchen (s. S. 448) auch.

In den ersten Tagen des Oktober 1957 war das Laub der Geisenheimer Schwarznußbäume bereits vergilbt und abgeworfen. Das auf einem Rasen bei sonnigen Wetter getrocknete Laub wurde gesammelt. Beim Abfall des Schwarznußblattes lösen sich zumeist die Fiedern von den starren Blattmittelrippen. Zu den Versuchen wurden nur die getrockneten Fiederblätter verwendet. Freies Juglon ließ sich aus den vertrockneten Fiederblättern weder durch unmittelbare Extraktion noch durch Ausschüttlung des daraus hergestellten Kaltauszuges mit Chloroform gewinnen. Der Kaltauszug selbst gibt mit KOH oder Ammoniak keine Rotfärbung (Juglonreaktion), wohl aber mit $FeCl_3$ die Phenolreaktion, was auf die darin enthaltenen Gerbstoffe zurückzuführen ist. Leitet man in einem Destillierkolben mit vorgeschaltetem Kühler Wasserdampf durch das Schwarznuß-

laub hindurch, so lassen sich im Destillat Stoffe auffangen, die von den im Blatt noch vorhanden ätherischen Ölen herstammen, und außerdem eine flüchtige Säure. Das Destillat weist einen p_H-Wert von 3,1 auf.

Zwanzig gleich große Tomatensämlinge, die in Pikiertöpfen angezogen worden waren, wurden in größere Töpfe (Durchmesser 12 cm) umgetopft. Bei diesem Umtopfen erhielt eine Hälfte als Versuchspflanzen je Topf 15 g lufttrockenes Schwarznußlaub unter die Komposterde gemischt. Die restlichen zehn Pflanzen dienten als Kontrollpflanzen. Der Versuch stand bei günstigem Witterungsverlauf in einem ungeheizten Gewächshaus.

Nach wenigen Tagen machten sich zwischen beiden Pflanzengruppen deutliche Unterschiede bemerkbar. Bei den Versuchspflanzen (mit Schwarznußlaub als Zusatz zur Erde) vergilbten die Keimblätter und schließlich auch die untersten Folgeblätter. Die Epidermen der Nerven der Blattunterseite sind stark anthocyanhaltig. Die Entwicklung der Tomaten verläuft ähnlich wie bei den „Kätzchenpflanzen" (vgl. S. 449), nur daß das Wachstum der Tomatenpflanzen infolge der herbstlichen Anzuchtverhältnisse langsamer vor sich geht.

Die Auswertung des Versuchs wurde in zwei Abschnitten vorgenommen (vgl. Tabelle 2). Innerhalb von 14 Tagen seit Versuchsbeginn erreichten die Versuchspflanzen nur 50% des Frischgewichtes der

Tabelle 2. *Tomatenversuch 92. Zugabe von lufttrockenem abgefallenen Herbstlaub von Juglans nigra zur Komposterde*

Angesetzt: 9. 10. 57 (je 5 Pflanzen), am 19. 10. 57 erste Hälfte geerntet.

	Blattzahl	Sproßlänge cm	Frischgewicht: g		Trockengewicht: g	
			Blätter	Sprosse	Blätter	Sprosse
Kontrollpflanzen	5,2	12,9	24,840 (100%)	10,800 (100%)	2,000 (100%)	0,640 (100%)
Versuchspflanzen J. n. Laub	4,4	11,2	15,500 (62,6%)	7,620 (70,6%)	1,540 (77,0%)	0,510 (79,7%)
am 24. 10. Rest, je 4 Pflz., geerntet:						
Kontrollpflanzen	6,0	16,0	24,250 (100%)	11,540 (100%)	1,950 (100%)	0,695 (100%)
Versuchspflanzen J. n. Laub	5,0	13,7	12,340 (50,8%)	7,590 (64,9%)	1,330 (68,2%)	0,675(!) (96,1%)

Kontrollpflanzen. Auffallend ist an der zweiten Hälfte, die am 24. 10. geerntet wurde, die Zunahme des Trockengewichts der Stengel der Versuchspflanzen bis auf 96% desjenigen der Kontrollpflanzen. Die daraufhin vorgenommene mikroskopische Untersuchung der Stengel ergab folgendes Bild:

1. Die *Versuchspflanzen*, deren Wurzeln mit dem Schwarznußlaub in Berührung gekommen waren, zeigten auf Längs- und Querschnitten

ihrer Stengel sowohl das Markparenchym als auch die innersten Rindenschichten *prall mit Stärke gefüllt*. Das mikroskopische Bild entsprach etwa dem durch das Speicherparenchym einer Kartoffelknolle.

2. Die Schnitte durch die Stengel der *Kontrollpflanzen* enthielten in den fraglichen Geweben *keine Stärke*. (Eine Ausnahme hiervon machten nur die Siebröhren der kleinen markständigen Leitbündel.) Die Zellen des Markparenchym verfügen über zahlreiche sehr kleine Chloro- bzw. Leukoplasten.

Die ungewöhnlich starke Speicherung der Kohlenhydrate im Parenchym des Stengels deutet darauf hin, daß dem normalen Ablauf zur Wurzel hin sich Schwierigkeiten in den Weg gelegt haben müssen und es an der Basis der Stengel zu einer Stauung und Anhäufung dieser Stoffe gekommen war. Hiermit in Zusammenhang dürfte auch der unterschiedliche Aschengehalt beider Pflanzengruppen stehen. Der Aschengehalt der Blätter der Kontrollpflanzen betrug 21,9%, derjenige der Versuchspflanzen nur 17,2% der Trockensubstanz.

Ähnlich wie bei den Versuchen mit der Kätzchenbeimischung zur Erde (vgl. S. 449) eine Hemmungs- und darauffolgend eine Förderungsphase im Wachstum der Tomaten zu beobachten war, so auch hier. In dem Maße wie die zugegebenen Schwarznuß-Blätter durch bakterielle Tätigkeit angegriffen wurden, schwindet, wenn auch nur langsam, die wachstumshemmende Wirkung dahin. Die Wirkung ist im ganzen nicht so intensiv, wie bei der Zugabe der Kätzchen zur Erde, aber dafür von längerer Dauer. Die Versuchspflanzen kamen vier Wochen nach Versuchsbeginn wieder ins Treiben, vermochten aber die Kontrollpflanzen in der Entwicklung nicht mehr einzuholen. Stülpt man eine Versuchspflanze in diesem Stadium um und löst den Ballen vorsichtig vom Blumentopf, so sind die in der Erde verteilten Schwarznußblätter von neugebildeten Tomatenwurzeln durchzogen. Die Kontrollpflanzen wiesen ein schwächer ausgebildetes Wurzelwerk auf.

Die Regentraufe von Juglans regia und Juglans nigra L.

Die Ergebnisse der bisher geschilderten Versuche machen soviel deutlich: Der das Wachstum der Tomate beeinträchtigende Stoff tritt aus den *oberirdischen Teilen*, vornehmlich dem *Laubblatt* der Nußbäume aus. Die Regentraufe des Blattes wie auch das frisch abgefallene tote Blatt vermögen die Wachstumshemmung herbeizuführen. Auch wenn der fragliche Hemmstoff in der Wurzel vorhanden ist, kommt er doch nicht als Ausscheidung an ihrer Oberfläche gegenüber der Tomatenwurzel zur Wirksamkeit. Dasselbe gilt für das lebende Blatt, solange eine Benetzung seiner Oberfläche durch Wasser und ein Abträufeln verhindert wird (vgl. Gefäßversuche S. 442). Die Autoren der vorhin zitierten amerikanischen Arbeiten (vgl. S. 440) über die allelopathische

Einwirkung der Nußbäume auf das Gedeihen einiger Solanaceen und Papilionaceen stimmen in der Annahme überein, das *Juglon* als den das Wachstum der Tomate schädigenden Stoff anzusprechen. Es wäre also als nächster Schritt zu untersuchen, ob denn Juglon oder seine Derivate in der Regentraufe des Nußbaums nachzuweisen sind. Um einen Überblick über alle mit der Rekretion und Exkretion des Nußblattes zusammenhängende Erscheinungen besser beurteilen zu können, wurde unter einer Anzahl von Bäumen von *Juglans nigra* und *J. regia* die Blatttraufe während der Vegetationsperiode 1957 aufgefangen. Hierbei wurde der Trockenrückstand, Aschengehalt, das Vorkommen von Juglon, der Gerbstoffgehalt, p_H- und rh-Wert fortlaufend registriert.

Methodisches. Als Auffangvorrichtung für die Regentraufe diente ein kreisrundes 90 cm hohes Eisengestell mit einem Durchmesser von einem Meter, über dessen Rand eine Polyaethylenfolie gespannt und mit Holzklammern befestigt war. In der Mitte dieser trichterförmigen Folie war als Ableitung ein Schlauch aus demselben Material eingesetzt. Das untere Ende des Schlauches mündete in eine 2,5 Liter Nährbodenflasche, die auf einer tellerartigen Haltevorrichtung unter dem Folientrichter stand und leicht auswechselbar war. Die unter den natürlichen Gegebenheiten im Freiland aufgefangene Blatttraufe ist durch Ruß, Staub usw. verunreinigt und mußte filtriert werden. Nach der Filtration ist die Traufe von *Juglans regia* bernsteingelb, bei Juglans nigra braungelb und ohne Trübung. Gerbstoff- und Juglonbestimmung wurden mit dem Langeschen Universal-Colorimeter durchgeführt. Die Gerbstoffbestimmung geschah in der von W. LANG (1939, S. 713) für die Gerbstoffe der Juglandaceen angegebenen Weise durch Zusatz von einigen Tropfen KOH zur filtrierten Traufe. Hierbei entsteht nach einer zuerst erscheinenden Rotfärbung (Juglonreaktion) eine Gelb- bis Braunfärbung. Als Standard diente eine Tanninlösung. — Zum Nachweis des Juglons wurden folgende Verfahren benutzt (vgl. HOFFMANN-OSTENHOF in PAECH u. TRACEY 1955):

1. Bei Zusatz von KOH tritt bei Anwesenheit von Juglon eine bordeauxrote Färbung auf. Die Farbreaktion ist unbeständig.

2. Ausschüttelung mit Chloroform und nachheriger Bestimmung mit alkoholischer Nickelacetatlösung. Eine alkoholische Lösung von synthetischem Juglon als Standard. (Untere Bestimmungsgrenze 15 γ)

3. Waren nur Spuren von Juglon vorhanden, so gelingt der qualitative Nachweis durch Überschichten des Chloroformauszuges mit etwas KOH. Nach kräftigem Umschütteln hat das Alkali das Juglon quantitativ an sich gerissen, die Alkalilösung zeigt Rosafärbung.

4. Sind Gerbstoffe und Juglon in der Traufe gleichzeitig vorhanden, so tritt bei Zusatz von KOH die oben schon erwähnte, durch das Juglon hervorgerufene Rotfärbung auf, die aber nach zwei bis drei Minuten verschwindet und einem gelben bis gelbbraunen Farbton Platz macht (Gerbstoffe). Der bei diesem Farbumschlag am lichtelektrischen Colorimeter zu beobachtende Extinktionsrückgang erwies sich der vorhandenen Juglonmenge proportional und wurde der Einfachheit halber als Juglontest benutzt.

Das Bild, das uns die Arbeiten von ARENS (1934), LAUSBERG (1934), FREY-WYSSLING (1935), MOTHES (1938), ENGEL (1939) u. a. m. von dem Zusammenspiel der äußeren und inneren Faktoren beim Zustandekommen der Re- bzw. Exkretion und ihres Niederschlages im Gehalt

der Traufe an anorganischen und organischen Bestandteilen vermittelt, bedarf für den Fall der Juglandaceen noch seiner speziellen Ergänzung. Von allgemeiner Bedeutung für die Höhe des Trauferückstandes sind: Der Witterungsverlauf seit dem letzten vorausgegangenen Regen, und die aus ihm resultierende Transpirations- und Assimilationsgröße, Niederschlagsmenge, Regenart und Windstärke (Bode 1940). Von wesentlichem Einfluß ist schließlich der Alterszustand des Blattes, der seinen Ausdruck findet in dem Widerstand, den Zellwand- und Plasma-

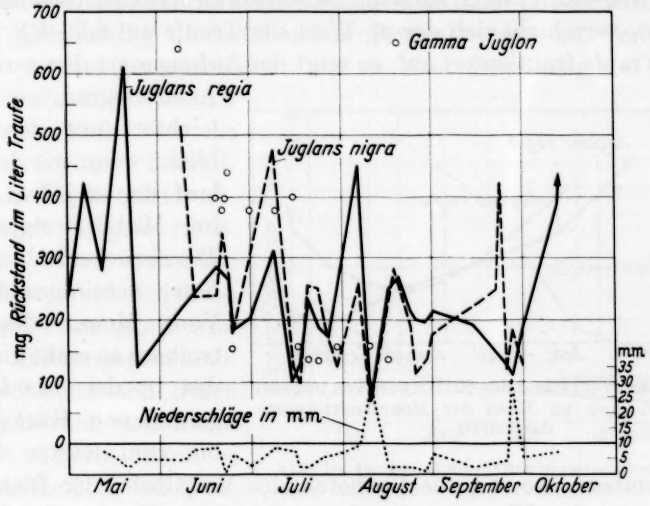


Abb. 8. Mengen des Gesamtrückstandes der Blatttraufe von *Juglans regia* und *Juglans nigra* während des Sommers 1957

grenzschichten dem Durchtritt der in der Blatttraufe nachzuweisenden Stoffe entgegensetzen (vgl. S. 457).

In der Abb. 8 sind für beide Nußarten *(Juglans regia* und *Juglans nigra)* die jeweilige Höhe des Gesamtrückstandes der während des Sommers 1957 unter Geisenheimer Nußbäumen aufgefangenen Traufen kurvenmäßig aufgezeichnet. Unmittelbar nach dem Austrieb ist bei den *Juglans-Arten* die in der Blatttraufe anzutreffende Stoffmenge am größten. Die ungemein rasch sich entfaltenden, großen gefiederten Blätter, sind in diesem Stadium durchscheinend zart und von Rosafärbung. Obgleich die Bäume von *Juglans nigra* diese Phase einen vollen Monat später und unter ganz anderen Witterungsbedingungen durchliefen als die von *Juglans regia*, zeigen doch die Kurven beider Arten in diesem Punkt einen sehr ähnlichen Verlauf.

Einem Hochschnellen der Niederschlagswerte (Abb. 8, unterste Kurve) entpricht im allgemeinen eine gegenläufige Bewegung der Kurven der Traufenrückstände. Die bei der Schwarznuß so auffallende Aufwärts-

bewegung ihrer Kurve am 8. Juli hängt damit zusammen, daß an diesem Tage durch einen Gewitterregen eine 9tägige Hitzeperiode mit Schattentemperaturen von 35° C beendet wurde (vgl. S. 458). Der Anteil der Aschensubstanzen am Gesamtrückstand schwankte zwischen 25 und 48 Prozent. — Der p_H-Wert der Blatttraufe von der Schwarznuß betrug im Durchschnitt 5,1—5,4, der der Walnuß war etwas nach dem Neutralitätspunkt hin verschoben (5,4—5,8). Der p_H-Wert des Regenwassers schwankte je nach Witterung und Reinheitsgrad der Luft zwischen 4,4—4,8. Nach längeren Schönwetterperioden, wie der oben erwähnten, verschiebt sich der p_H-Wert der Traufe auf 6,2—6,8. Fängt man die Traufe fraktioniert auf, so zeigt der Anfangswert den geringsten Aziditätsgrad. — Es erleichtert uns den Überblick, wenn wir den Verlauf der in jedem Monat im Mittel festgestellten Trauferückstände in einer Kurve vereinigen (Abb. 9). Vom Monat des Austreibens an sinkt die Höhe des in der Traufe aufgefundenen Rückstandes bis zum letzten Drittel des Septembers, wo wir die Vorboten des Vergilbens der Blätter im Wiederanstieg des Wertes wahrnehmen können. Was für den Trauferückstand als Ganzes gilt, gilt nicht in demselben Maße für jede seiner Komponenten. Verfolgen wir den Gerbstoffgehalt der Traufe während der einzelnen Monate (Abb. 10), so finden wir bei *Juglans regia* bei einem relativ niedrigen Anfangswert nur im Monat Mai ein spürbares Absinken. Bei *Juglans nigra* fällt die Kurve während der Monate Juni und Juli steil bis auf ein Drittel des Anfangswertes ab. Die Traufe der Schwarznuß weist vom ersten Regentage an die Juglonreaktion auf (vgl. Abb. 8). Bei der von *Juglans regia* herstammenden Traufe unterbleibt die Reaktion während der ersten vier Wochen nach dem Austrieb. Es ist möglich, daß dieses Ausbleiben darauf zurückzuführen ist, daß das Dihydrojuglon bei seinem Austritt aus den Plasmagrenzschichten der Epidermis mit anderen Stoffen eine Verbindung eingeht, die die Juglonreaktion mit KOH nicht mehr gibt. Für diese Annahme spricht folgende Beobachtung: Setzt man einer in den ersten Wochen aufgefangenen Traufe von *Juglans regia* 500 γ synthetisches Juglon zu, so ergibt eine nach zwei Minuten vorgenommene Chloroformausschüttelung nur noch 220 γ freies Juglon. Mehr als die Hälfte des zugefügten Juglons war inzwischen gebunden worden. Dem Anschein nach gleiche

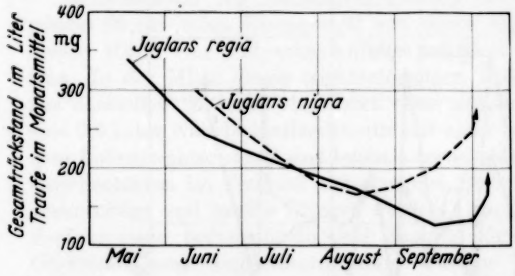


Abb. 9. Gesamtrückstand der Blatttraufe von *Juglans regia* und *J. nigra* an Hand der Monatsmittelwerte dargestellt

Witterungsbedingungen ergaben häufig unerwartete Abweichungen in dem Gehalt der Traufe. So kam es das eine Mal zu einer starken Juglonabgabe, das andere Mal zu einem Ausbleiben der Juglonreaktion. — Hierbei wollen wir die nach langer Regenpause zu beobachtende vermehrte Alkaliansammlung auf der Blattoberseite und die dabei möglicherweise vor sich gehende Bindung des Juglons einmal als Sonderfälle außer Betracht lassen. — Bei diesen Unregelmäßigkeiten in der Stoffabgabe der Blattoberflächen spielen vielmehr die Begleitumstände, unter denen der Regen fällt, eine wesentliche Rolle (Bode 1940, S. 577).

Bei gleichmäßig niederfallendem Regen kommt es, von geringen Spritzwassermengen abgesehen, nur zu einer Benetzung der Oberseite des Schwarznußblattes und die Traufe fließt über die langausgezogene Träufelspitze der Fiederblätter ab. Bei einem Regen (z. B. Gewitter) mit starken Windböen werden jedoch die vor Feuchtigkeit triefenden Blätter gegeneinander geschlagen und durch den Winddruck zusammengepreßt. Hierbei kann es nicht ausbleiben, daß beide Blattseiten vom Regen benetzt werden (am Standort beobachtet). Ein ähnliches Resultat kann ein wallender Sprühregen haben. Es erschien daher wünschenswert, die Abgabe der *Blattober-* und *Unterseite* getrennt zu studieren. Die ungleich gefiederten mit starker Mittelrippe versehenen Blätter von *Juglans nigra* umstehen den Kurztrieb in Form eines ausgebreiteten Fächers. Die unmittelbar benachbarten Blätter eines solchen Fächers arbeiten daher fast unter denselben Assimilations- und Transpirationsbedingungen.

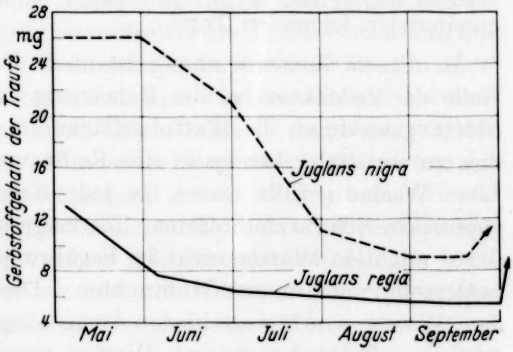


Abb. 10. Gerbstoffgehalt der Blatttraufen von *Juglans nigra* und *Juglans regia* während des Sommers 1957

Die zu den Versuchen benutzten Blätter wurden um 16 Uhr am Baum entnommen und die Schnittflächen ihrer Blattstiele mit Vaseline verstrichen. Unmittelbar darauf wurde je die gleiche Anzahl von Blättern mit der *Oberseite*, die anderen mit der *Unterseite* in großen flachen Porzellanschalen (Durchmesser 35 cm) auf Aqua bidest. schwimmen gelassen. Hierbei kamen die Blattstiele auf den Rand zu liegen. Nach zehn Minuten wurde das Wasser abgegossen und auf seinen Juglon- und Gerbstoffgehalt hin untersucht. Zur Oberflächenbestimmung wurden die Blätter planimetriert.

Das in Tabelle 3 aufgeführte Beispiel zeigt, daß die maximale Stoffabgabe der *Oberseite* nur einen Bruchteil derjenigen der *Unterseite* ausmacht. Welchen außerordentlichen Schwankungen dieses Verhältnis ausgesetzt sein kann, lehren die unter recht verschiedenartigen

Tabelle 3. *Verschieden hohe Abgabe von Ober- und Unterseite des Schwarznußblattes, berechnet auf 500 cm² Oberfläche*

	Gerbstoff: mg im Liter			Juglon: γ im Liter		
Datum	6. 9.	9. 9.	10. 9.	6. 9.	9. 9.	10. 9.
Blätter:						
Auf der *Oberseite* schwimmend . .	5,4	2,0	0,8	70	80	20
Auf der *Unterseite* schwimmend .	21,1	12,5	5,4	620	240	48
Witterung	6. 9. wolkenlos, Mittagstemp. 22° C 9. 9. trüb, Sprühregen 10. 9. bedeckt, kühl					

Witterungsbedingungen zustandegekommenen Werte der im Protokoll aufeinander folgenden Tage.

In diesem Zusammenhang ist noch die Frage zu erörtern, welche Rolle der Zeitfaktor bei der Benetzung und der daraus resultierenden Stoffabgabe durch die Blattoberfläche an das Regenwasser spielt. Um dies zu ermitteln, kamen in eine Reihe von Schalen, die mit je einem Liter Wasser gefüllt waren, in jede Schale 100 g frisch vom Baum gepflückte Schwarznußblätter. Die angeschnittenen Blattstiele kamen dabei mit dem Wasser nicht in Berührung, während die Blattspreiten beiderseits vollkommen eintauchten. Die Dauer der Benetzung mit dem Wasser wurde verschieden lange ausgedehnt. Das nach einer bestimmten Zeit abgegossene Wasser wurde filtriert und auf seinen Gerbstoffgehalt hin untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4. *Gerbstoffgehalt in Abhängigkeit von der Benetzungsdauer der Blatttraufe*
12. 8. 57. Tag sonnig, Haufenwolken, seit 48 Std kein Niederschlag.

Benetzungsdauer	2 Minuten	14,0 mg Gerbstoff je Liter
„	3 „	14,8 „ „ „
„	5 „	15,0 „ „ „
„	15 „	15,6 „ „ „
„	30 „	18,2 „ „ „

Schon die kürzeste, nach zwei Minuten unterbrochene Benetzungsdauer hatte einen Gerbstoffgehalt von 14 mg im Liter zur Folge und zeigte die für die Schwarznußtraufe typische Eigenfärbung. Bei den länger währenden Benetzungszeiten wies die weitere Zunahme des Gerbstoffgehaltes nur noch eine geringe Steigerung auf. Nach einer halben Stunde war ein Mehr von 4,2 mg im Liter gegenüber dem Anfangswert festzustellen. Es kann sich also nur um oberflächlich gelagerte Stoffe handeln, die in einer so kurzen Zeitspanne durch das Wasser in Lösung gebracht werden konnten. Hierfür kommen in Frage Ausscheidungen auf der Cuticula, die sich über die gesamte Fläche der Epidermis hin

verteilen, oder eine spezielle, die von Drüsenhaaren ausgeht. Die Blätter von *Juglans nigra* haben auf ihrer Unterseite langgestielte Drüsenköpfchen, die Gerbstoffe und Juglon führen. Wäscht man die Blätter vor Versuchsbeginn mit Wasser ab, so weist das Filtrat die für die Schwarznußtraufe typische Eigenfärbung nicht auf, es erscheint vollkommen farblos. Läßt man diese Lösung 24 Stunden stehen, so tritt die der Schwarznußtraufe eigene Gelb-Braunfärbung auf. Der Gerbstoffgehalt der zuvor gewaschenen Blätter erreicht nach einer halben Stunde noch nicht den Anfangswert des unbehandelten Blattes. Daraus kann gefolgert werden, daß Stoffe, die mit dem Transpirationswasser oder als Exkret durch die Cuticula des Blattes nach außen hindurchgetreten sind, bei jeder Benetzung durch den Regen alsbald in Lösung gehen. Es ist daher einwandfreier, die durch Verunreinigung der Atmosphäre eingetretene Verschmutzung in solchen Fällen in Kauf zu nehmen, um nicht einen beträchtlichen Trauferückstand mitfortzuspülen (vgl. Engel 1939, S. 818). Ein Vergleich zwischen den für die Gerbstoffe und das Juglon gefundenen Mengenwerte und denen des organischen Anteils am Gesamtrückstand macht es deutlich, daß wir damit nur einen kleinen Teil der Traufenstoffe bisher definiert haben. Klarheit über diese noch nicht näher gekennzeichneten übrigen organischen Verbindungen werden wir erst mit Hilfe der papierchromatographischen Analyse, die eingeleitet ist, erwarten dürfen. Das Juglon war dadurch in den Vordergrund der Betrachtung getreten, daß es von den amerikanischen Forschern als das eigentliche Agens der Wachstumsbeeinflussung zwischen Nußbaum und Tomatenpflanze angesprochen worden ist. Es erscheint daher nur folgerichtig, wenn wir uns im nächsten Abschnitt mit seinem speziellen Einfluß auf das Wachstum der Tomate beschäftigen. Da aus den Untersuchungen über die Beziehungen zwischen α-Naphtochinon und Gerbstoffhaushalt der Juglandaceen (W. Lang 1939) eine gewisse Koppelung beider hervorgeht, ergab sich eine Einbeziehung der Gerbstoffe in die Untersuchung.

Der Verlauf des Wachstums der Tomate unter dem Einfluß einzelner Komponenten der Juglanstraufe

Die ersten Versuchsreihen galten der Beantwortung der Frage, ob das Juglon einen Einfluß auf die Gesamtproduktion der Tomatenpflanze ausübt. Da das Juglon im Freiland mit der Traufe der Nußbäume sowohl auf die Blätter als auch in den Boden sickert und so zu den Wurzeln der Tomaten gelangen kann, wurden die Tomaten einer Versuchsreihe in drei Gruppen eingeteilt, die verschieden behandelt wurden. Zur Verwendung kamen Tomatenpflänzchen, die außer den Keimblättern das erste Folgeblatt entwickelt hatten.

Tabelle 5. *Versuch 70*
Angesetzt 29. 3.; abgebrochen 25. 4. 57: Sorte „Golden Star".

	Insgesamt oberirdisch	Stengel	Blätter	Wurzeln
	Frischgewicht in g			
Kontrolle . . .	39,200 (100%)	12,500 (100%)	26,700 (100%)	23,350 (100%)
Juglon/Blätter .	29,850 (76%)	8,250 (70%)	21,600 (81%)	17,900 (77%)
Juglon/Wurzel .	24,500 (63%)	6,800 (54%)	17,700 (66%)	16,450 (70%)
	Trockengewicht in g			
Kontrolle . . .	4,450 (100%)	1,000 (100%)	3,450 (100%)	1,760 (100%)
Juglon/Blätter .	3,420 (77%)	0,720 (72%)	2,700 (79%)	1,510 (86%)
Juglon/Wurzel .	2,760 (62%)	0,490 (49%)	2,270 (66%)	1,490 (85%)

Die Pflanzen wurden in v. d. Cronescher Nährlösung unter Zusatz von Hoaglands A-Z-Lösung gezogen. Gruppe I bildete die Kontrollpflanzen. II. Pflanzen, deren Blätter täglich morgens und abends mit einer Lösung von synthetischem Juglon[1] (1 oder 2 mg Juglon im Liter Wasser) mit einem Zerstäuber besprüht wurden. Die III. Gruppe erhielt dieselbe Juglonmenge an die Wurzel gegossen. Wenn Gruppe II eine Juglonbesprühung bekam, wurde I und III mit reinem Wasser besprüht. — Es wurde hierbei darauf geachtet, daß alle drei Gruppen die gleiche Nährlösungskonzentration behielten.

Tabelle 6. *Tomatenversuch 82*
Angesetzt 12. 6. 57; geerntet 16. 7. 57; Tomatensorte „Haubners Vollendung"; Quarzsandkultur v. d. Crone + A-Z-Lösung; Besprühung mit synthetischer Juglonlösung, 2 mg im Liter.

	I. Kontrolle	II. Juglon/ Blätter	III. Juglon/ Wurzel
	Frischgewicht in g		
Blätter . .	59,70 100%	39,75 67%	37,50 63%
Stengel . .	34,11 100%	20,35 60%	24,70 72%
Wurzel . .	50,21 100%	33,40 67%	35,86 71%
	Trockengewicht in g		
Blätter . .	7,41 100%	5,20 70%	4,79 65%
Stengel . .	3,76 100%	1,95 52%	2,19 56%
Wurzel . .	4,20 100%	2,67 64%	2,66 63%
Asche der Blätter .	16,8%	17,1%	17,5%

Die Resultate für die Frisch- und Trockengewichte einer derartigen Versuchsreihe gibt die Tabelle 5 wieder.

Die von den Kontrollpflanzen erreichten Werte gleich 100 gesetzt, ergab sich durch eine Besprühung der oberirdischen Teile der Tomaten mit Juglon ein Absinken des Gesamtfrischgewichtes auf 76%. Die Stengelgewichte gehen hierbei stärker zurück als die Blattgewichte. Bei Zugabe des Juglons in den Quarzsand an die Wurzel der Tomatenpflanzen war das Gesamtgewicht noch niedriger (63%). Auffallend ist das relativ hohe Wurzelgewicht bei den Gruppen II und III, was besonders bei den Werten für das Trockengewicht zum Ausdruck kommt.

[1] Bezogen durch „Feinchemie" Berlin.

Gegenüber diesem im April durchgeführten Versuch veränderten sich die entsprechenden Prozentzahlen im Hochsommer nicht unwesentlich. Tabelle 6 gibt einen Versuch aus dem Juni-Juli wieder. Die Werte für die mit Juglon besprühten Pflanzen sind in ihren Stengel- und Blattprozenten auf 60 bzw. 67% abgesunken und liegen jetzt unter denen der III. Gruppe, deren Pflanzen das Juglon nur mit den Wurzeln aufgenommen hatten. Bei den Trockengewichten sind die Unterschiede zwischen den Pflanzen der II. und III. Gruppe einander genähert. Bei gleicher Ernährungsbasis führt das Juglon zu einer erheblichen Wachstumsverminderung gegenüber den Kontrollpflanzen. Hierbei treten geringe Unterschiede auf, je nachdem ob das Juglon als Sprühregen über die Blätter oder nur mit der Nährlösung der Wurzel gegeben wird.

Vergleichen wir in entsprechenden Quarzsandversuchen die Wirkung des Juglons mit derjenigen einer Blatttraufe der beiden *Juglans*-Arten. Hierüber gibt uns eine Versuchsreihe Aufschluß, deren Ergebnisse in der Tabelle 7 wiedergegeben worden sind. Das Frisch- und Trocken-

Tabelle 7. *Tomatenversuch 74*

Angesetzt 13. 5. 57, abgebrochen 21. 6. 57; Tomatensorte „Haubners Vollendung"; Traufe von *Juglans regia*.

Oberirdische Teile insgesamt: Mittel von vier Pflanzen	Frischgewicht g	Trockengewicht g	Blattzahl	Sproßlänge[1] mm
Kontrolle	16,370 (100%)	1,800 (100%)	8—9	124
Traufe/Blätter	12,280 (75%)	1,270 (70%)	6	120
Traufe/Wurzel	15,400 (94%)	1,740 (94%)	7—8	147

[1] Sproßlänge von den Kotyledonen ab.

gewicht bei den mit der Blatttraufe von *Juglans regia* besprühten Tomatenpflanzen ging, Kontrollpflanzen = 100 gesetzt, auf 75 bzw. 70% zurück. Die Verabfolgung derselben Traufenmenge an die *Wurzeln* der III. Gruppe hatte nur ein geringes Nachlassen des Wertes auf 94% zum Ergebnis. — Die Pflanzen der drei Versuchsgruppen zeigten in der Entwicklung ihrer Wurzelsysteme deutliche Unterschiede auf (Abb. 11). Die mit der Traufe besprühten Pflanzen (Wurzel am weitesten links) stellen im Habitus eine verkleinerte Ausgabe der Kontrollpflanzen dar (Kontrolle). Das Begießen des Quarzsandes mit der *Juglans*-Traufe hat eine Vermehrung der Seitenwurzelbildung zur Folge (zweite Wurzel von rechts).

Bei der Verwendung der Traufe von *Juglans nigra* verringerten sich die Werte des Frisch- und Trockengewichtes viel stärker als bei derjenigen von *Juglans regia*. Die entsprechenden Zahlen sind aus der

Tabelle 8. *Tomatenversuch 84*

Angesetzt 22. 6. 57, geerntet 4. 7. 57; Sorte „Haubners Vollendung"; Komposterde; Besprühung mit Schwarznuß-Traufe.

Mittel von je 9 Pflanzen in g	Frischgewicht		Trockengewicht	
	Blätter	Stengel	Blätter	Stengel
Kontrollpflanzen . . .	38,990	27,740	3,320	1,305
Kontrollpflanzen . . .	100%	100%	100%	100%
Traufepflanzen	25,990	15,990	2,140	0,746
Traufepflanzen	64%	58%	65%	57%

Als Schwarznußtraufe wurde ein Abguß verwendet, der durch Eintauchen von 100 g frischer Schwarznußblätter in ein Liter Aqua bidest. gewonnen wurde. Eintauchdauer 30 Minuten (vgl. S. 458).

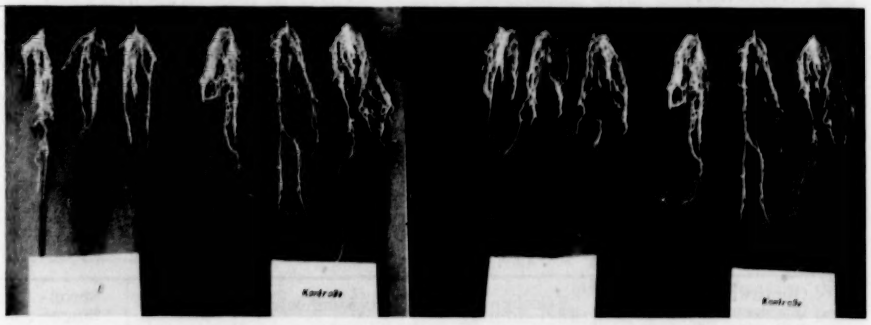


Abb. 11. Die Einwirkung von Juglonlösungen auf die Ausbildung des Wurzelsystems bei Tomaten. 1. u. 3. Wurzel von rechts Kontrollpflanzen; 2. von rechts Juglon an die Wurzeln gegeben; 1. von links Juglon auf die Blätter gesprüht

Tabelle 8 zu ersehen. Dieses Ergebnis wurde an einer Versuchsreihe gewonnen, bei der die Tomatenpflanzen unter sehr günstigen Vegetationsbedingungen in Komposterde heranwuchsen. Die Blatttraufe der Schwarznuß ist in allen überhaupt durchgeführten Versuchsreihen von wesentlich größerer Wirksamkeit auf das Wachstum der Tomate als die der Walnuß (vgl. Abb. 12 u. 13).

Bei der Besprechung der „Kätzchenversuche" (vgl. S. 450) konnten wir darauf hinweisen, daß eine als Gießwasser benutzte Abkochung von Schwarznußkätzchen keine Hemmung im Wachstum der Tomaten zu erzeugen vermag. Eine derartige Kätzchen-Abkochung enthält neben nicht näher identifizierten Stoffen erhebliche Mengen von Gerbstoffen. Es fragt sich nun, ob eine Besprühung der Blätter mit Gerbstoffen gleichfalls auf das Wachstum der Tomate ohne hemmenden Einfluß bleibt. Die Antwort gibt Tabelle 9.

Die tägliche Besprühung mit einer schwachen Tanninlösung setzt das Frisch- und Trockengewicht der Tomatenpflanzen gegenüber den Kontrollen auf die Hälfte herab. Ein Begießen mit der gleichen Tannin-

lösung führte ähnlich, wie bei der Abkochung der Schwarznußkätzchen, zu einer Vermehrung der Gesamtproduktion.

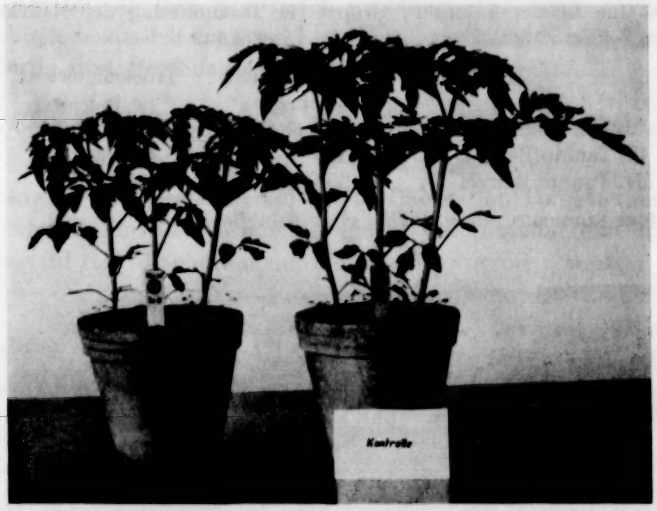


Abb. 12. Die Beeinträchtigung der Tomaten durch eine Besprühung mit der Blatttraufe von *Juglans nigra*. Rechts: Kontrollpflanzen; links: mit Schwarznußtraufe besprüht

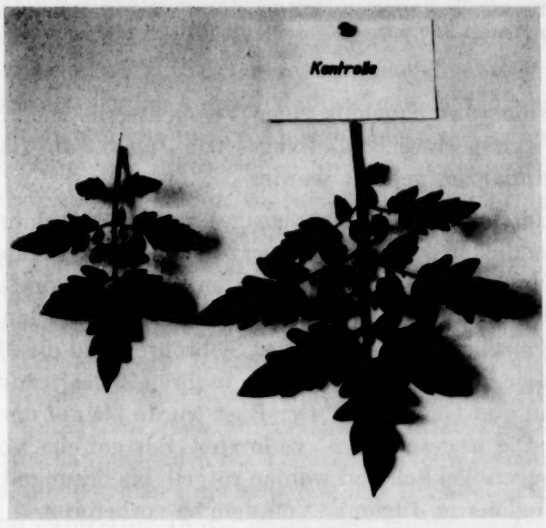


Abb. 13. Unterschiede in der Blattentwicklung bei Tomaten als Folge der Bestäubung mit der Blatttraufe von *Juglans*. Rechts: gleich altes Blatt der Kontrollpflanze; links: Pflanze täglich mit Schwarznußtraufe besprüht

Da Massey (1925) zum Nachweis der Giftigkeit der von ihm angenommenen Wurzelausscheidungen der *Juglans*-Arten seinen Nährlösungskulturen von Tomaten Rindenstücke der Schwarznuß zugesetzt

Tabelle 9

Tomatenversuch 75: angesetzt 15. Mai 57; geerntet 19. Juni 57; Quarzsand, v. d. Cronesche Nährlösung, A-Z-Lösung; Gruppe I Kontrolle; Gruppe II Tanninlösung auf die Blätter gesprüht; Gruppe III Tanninlösung der Nährlösung zugesetzt; in beiden Fällen 50 mg Tannin im Liter Aqua bidest.[1]

	Frischgewicht in g	Trockengewicht in g
I. Kontrolle	8.490 (100%)	0.950 (100%)
II. Tannin/Blätter . . .	4.540 (54%)	0.460 (48%)
III. Tannin/Wurzel . . .	11.900 (140%)	1.160 (123%)

[1] Acidum tannicum puriss. leviss. clare solubile Merck.

Abb. 14. Tomatenwachstum unter der Einwirkung von Bastauszügen von *Juglans regia*. Rechts: von der Wurzel her; Mitte: Kontrolle; links: Besprühung der Pflanzen mit dem Bastauszug

hatte, möge hier das Ergebnis einer Versuchsserie angeführt werden, in der die Wirkung eines Bastauszuges von *Juglans* auf das Wachstum von Tomatenpflanzen geprüft wurde.

Bei der Herstellung des Bastauszuges wurde so verfahren, daß von einem daumendicken Zweig von *Juglans regia* das Periderm und die chlorophyllführenden Rindenschichten mit dem Skalpell abgetragen wurden. Der darunterliegende Bast, insonderheit die langgestreckten Bastparenchymzellen, Geleitzellen der Siebröhren und die Markstrahlenzellen, soweit sie im Bast liegen, führen in ihren Zellsafträumen reichlich Dihydrojuglon und Gerbstoffe. Der Bast wurde bis auf den Holzkörper abgeschabt. Die abgeschabten, verletzten Bastgewebe verfärben sich an der Luft augenblicklich und werden rotgelb bis braungelb (Oxydation des Dihydrojuglons zu Juglon). Von dem so vorbereiteten Bast wurden 4—5 g in 250 ml Wasser gebracht, gut umgeschüttelt, und nach 10 Minuten filtriert. Der Bastauszug enthielt im Mittel 2—3 mg Juglon und etwa 25—30 mg Gerbstoff im Liter. Bei höheren Juglonkonzentrationen treten an der Wurzel Schädigungen auf. Der Bastauszug wurde stets frisch bereitet, da die in ihm reichlich enthaltenen Oxydasen die Lösung alsbald verfärbten (Abb. 14).

Ein schwacher Kaltauszug aus der Rinde der Walnuß hat einen Rückgang des erreichten Frisch- und Trockengewichtes der Tomaten um ein Drittel, an den Kontrollen gemessen, zur Folge. Wesentliche Unterschiede bezüglich des erreichten Frischgewichtes bestehen zwischen Besprühung und Begießen mit dem Bastauszug nicht.

Über die Rolle der kleinen Drüsenhaare des Tomatenblattes bei der Aufnahme des Benetzungswassers

Da sowohl ein Besprühen der Oberfläche der Tomatenblätter mit Juglon oder Regentraufe, wie ein Begießen der Wurzeln, eine spezifische Reaktion auf das Wachstum der Tomate hervorrufen, müssen wir eine Aufnahme derartiger Stoffe durch die Oberfläche der Epidermen des Tomatenblattes voraussetzen. Es ist bekannt, daß das Tomatenblatt die Fähigkeit besitzt, in Wasser gelöste Stoffe durch seine Blattoberfläche aufzunehmen (Aufnahme von Harnstoff und Zucker s. Hilton u. Shaw 1956). Weniger bekannt ist der Weg, auf dem diese Aufnahme durch die Blattepidermen erfolgt. Ist jede beliebige Oberflächenzelle daran beteiligt? Unter dem Eindruck der Entdeckung der *Ektodesmen* (Schumacher u. Halbsguth 1939, Schumacher 1942, Lambertz 1954, Schumacher u. Lambertz 1956) mit ihrer enormen Oberflächenvergrößerung der in der Außenmembran vorhandenen Plasmagrenzschichten wird man geneigt sein, hier den Zugangsort für die Aufnahme durch die Blattoberfläche zu suchen; besonders nachdem von Schumacher neuerdings gezeigt werden konnte, daß auf eine Zuführung bestimmter organischer Stoffgemische in der Außenlösung die Epidermiszellen mit einer Vermehrung der Ektodesmen in der Außenwand antworten. Er läßt aber die Frage offen, ob es sich hierbei nicht um einen Reizvorgang handeln könnte (Schumacher u. Lampertz 1956). Es könnte ja aber auch sein, daß spezielle Organe in Gestalt bestimmter Haare an der Stoffaufnahme aus dem Benetzungswasser beteiligt sind. Das Tomatenblatt ist reich an verschieden gebauten Haarformen. Da gibt es vielzellige Borstenhaare, langgestielte Drüsenhaare, unter deren abgehobener Cuticula in reichlichen Mengen gelbes ätherisches Öl vorhanden ist. Außer den eben aufgeführten besitzt die Oberfläche des Tomatenblattes hauptsächlich im Verlauf der Nerven eine Form kleiner Drüsenhaare, die in großer Zahl zwischen den Borstenhaaren eingestreut zu finden sind (Abb. 15). In der Mitte einer langgestreckten Epidermiszelle erhebt sich eine kümmelkornartig gekrümmte „Mittelzelle", an die sich nach außen ein Drüsenköpfchen mit acht Zellen anschließt. Durch die Krümmung der „Mittelzelle" bedingt, liegen die äußersten Zellen des Köpfchens, lippenförmig auseinandertretend, der Nervenoberfläche fast auf. Die „Mittelzelle" hebt sich bei der Chlorzinkjodfärbung durch ihre leuchtend gelbbraune Färbung aus dem violetten Unter-

grund der übrigen Epidermiswandung heraus. Die Köpfchenzellen haben eine hauchdünne Cuticula, unter der nur Pektinlamellen zu liegen scheinen. Die acht Zellen des Köpfchens haben auffallend große Kerne, die sich leicht mit Karminessigsäure färben lassen. Die Zellen zeigen keine Vacuolenbildung und sind reich an Alkaloiden. Interessant ist es, daß die vier oberen Zellen nach innen zu auseinandertreten und einen kleinen Intercellulargang zwischen sich bilden, der von der Membran nach außen abgeschlossen bleibt.

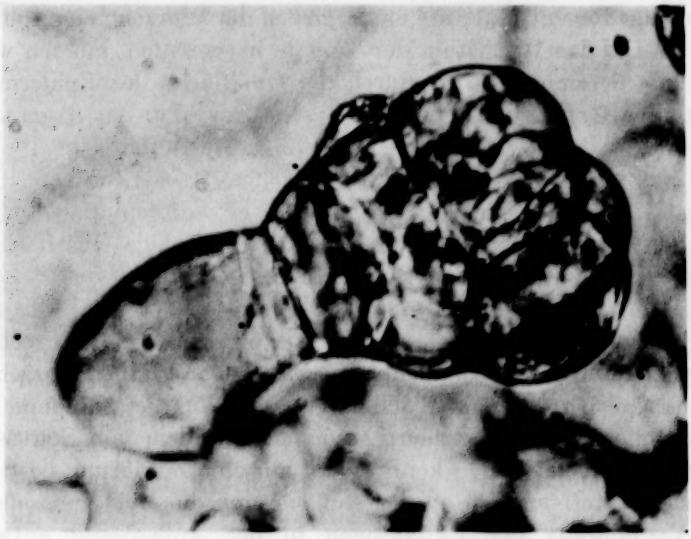


Abb. 15. Als „Taudrüse" angesprochenes Drüsenhaar von der Oberseite der Blattnerven der Tomate. Vergr. 900 ×

Was spricht außer ihrer anatomischen Bauart für eine Beteiligung dieser Drüsen an der Wasser- und Stoffaufnahme des Blattes? Läßt man turgescente Tomatenblätter mit ihrer Oberseite auf einer schwachen Methylenblaulösung in einer feuchten Kammer schwimmen, so wird man auch nach Stunden keine Blaufärbung der oben beschriebenen Drüsenhaare beobachten können. Legt man dagegen *gewelkte Blätter* mit der Oberseite auf eine Methylenblaulösung, so zeigen sich nach drei Stunden die kleinen Drüsenhaare stark blau gefärbt. Der Farbstoff wird hierbei zu einem Teil im Plasma der Köpfchenzellen zur Ausfällung gebracht. Die „Mittelzelle" bildet gegen den Farbübertritt in die als Fußzelle fungierende langgestreckte Epidermiszelle eine Barriere. Die übrigen Haarbildungen der Oberseite des Tomatenblattes beteiligen sich an der Aufnahme des Methylenblaus nicht (höchstens in verletztem Zustand). — Nimmt man statt der Methylenblaulösung eine Schwarznußtraufe, so ergibt die Membranzone der lippenartig aufgetriebenen

oberen Zellen des Köpfchens mit KOH eine schwache Juglonreaktion. — Auch bei anderen Solanaceen kommen ähnliche Drüsenhaare vor. So hat v. MINDEN (1899) solche bei Tabakblättern beschrieben und als Haarhydathoden gedeutet (vgl. auch FREY-WYSSLING 1935, S. 298). — Sollten diese kleinen Drüsenhaare der Tomate wesentlich an der Aufnahme des Benetzungswassers beteiligt sein, würde man sie besser als *Taudrüsen* ansprechen[1]. Eine Flächenguttation wie beim Tabak habe ich beim Tomatenblatt nicht beobachten können. Das Tomatenblatt verfügt ja über reichliche Wasserspalten für die Guttationsabscheidung.

Die Beeinflussung der Internodienlängen durch Juglon und Regentraufe

Eine andere, bei den Quarzsandversuchen (mit Juglon, Traufe usw.) zutage tretende Erscheinung verdient unsere besondere Aufmerksamkeit. Vergleichen wir die Internodienlängen der drei Versuchsgruppen miteinander, so war zu erwarten, daß die absoluten Werte die in den Tabellen der Quarzsandkulturen erreichten unterschiedlichen Produktionswerte widerspiegeln werden. Ein Blick auf die relativen Längenunterschiede läßt uns hier andere Zusammenhänge vermuten. In den Kurven der Abb. 16 ist die Länge des ersten, also untersten Internodiums = 100 gesetzt worden. Die unter Einwirkung der jeweiligen Gruppenbehandlung erreichten Längenwerte der später gebildeten Sproßglieder sind in Prozenten des Anfangswertes ausgedrückt. Bei den Pflanzen, die das Juglon zur Nährlösung und damit an die Wurzel erhalten hatten (Juglon/Wurzel), folgt der Verlauf der Kurve, bis auf das zweite Internodium, bei dem deutlich eine Schockwirkung durch das Juglon zu erkennen ist, im übrigen dem der Kontrollpflanzen. Die Kurve liegt im ganzen nur etwas *tiefer* als die der Kontrollen.

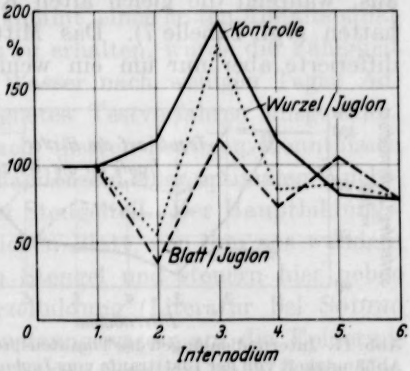


Abb. 16. Der Einfluß des Juglons auf das Streckenwachstum von Tomatensprossen

Die mit Juglon besprühten Pflanzen (Juglon/Blätter) wiesen dagegen im Verlauf der Kurve ihrer Internodienlängen einen abweichenden Verlauf gegenüber den Kontrollpflanzen auf. Die Verkürzung im zweiten Internodium ist hier stärker ausgebildet wie bei der vorigen Gruppe (Juglon/Wurzel). Einem bedeutend geringeren Längenzuwachs des

[1] In diesem Zusammenhang sei auf die quantitativen Messungen der Benetzbarkeit von Blattoberflächen verwiesen (LINSKENS 1950, S. 597). Das Tomatenblatt zählt zu den gut benetzbaren Blättern. Erwähnt sei seine Feststellung: „Die Benetzbarkeit auf dem gleichen Blatte zeigt Maxima über den Blattnerven."

3. Internodiums und der Abnahme im vierten folgt im 5. Internodium wiederum eine über das Maß der beiden anderen Gruppen hinausgehende Längenzunahme.

Die Wirkung der *Juglans*-Traufe auf die Länge der Sproßglieder der Tomate weist eine umgekehrte Tendenz auf. Die Internodienlängen liegen bei den „Traufepflanzen" unter den bei den Versuchen obwaltenden Verhältnissen höher als bei den Kontrollpflanzen. Die mit der Walnuß-Traufe besprühten Pflanzen bildeten im Mittel nur 6 Blätter aus, während die gleich alten Kontrollpflanzen 8—9 Blätter gebildet hatten (vgl. Tabelle 7). Das Mittel der Gesamtlänge beider Gruppen differierte aber nur um ein weniges voneinander (124:120). Es war daher zu erwarten, daß unter den sechs von den „Traufepflanzen" gebildeten Internodien einige länger sein mußten als die entsprechenden der Kontrollpflanzen. Die ausgemessenen Längen der Internodien aller drei Gruppen sind in Abb. 17 in Kurvenform wiedergegeben.

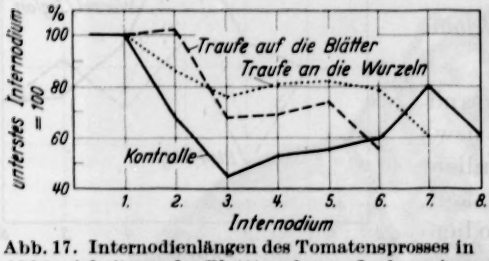


Abb. 17. Internodienlängen des Tomatensprosses in Abhängigkeit von der Blatttraufe von *Juglans nigra*

Dem Zurückgehen der Internodienwerte der Kontrollpflanzen im zweiten und dritten Internodium folgt die „Traufenpflanze" mit starker Abschwächung der fallenden Tendenz. Die Sproßglieder der „Traufepflanzen" behalten eine *größere Streckung* bei als die Kontrollpflanzen.

Bei Tomatenpflanzen, die in Quarzsandkulturen in einer Nährlösung eine tägliche Besprühung mit einer schwachen Juglonlösung bekommen, tritt eine Verkürzung der Internodien gegenüber der Kontrollpflanzen ein. Die beträchtliche Schwankung des prozentualen Ausmaßes der Verkürzung führt zu einem Pendelverlauf der Kurve.

Eine Zugabe der gleichen Juglonmenge über die Nährlösung an die *Wurzel* der Tomaten führt zu einer gleichmäßigen Verkürzung der Internodienlängen, gemessen an den Kontrollpflanzen.

Die tägliche Besprühung mit einer Regentraufe einer der beiden *Juglans*-Arten beantworten die Tomatenpflanzen, verglichen mit den Kontrollpflanzen, zwar mit einer Verringerung der Internodienzahl, aber mit einer relativen Streckung des einzelnen Internodiums.

Über den Einfluß des Juglons und der Schwarznußtraufe auf die Adventivwurzelbildung abgeschnittener Tomatensämlinge

Wenn eine geringfügige Menge eines Stoffes noch sichtbaren Einfluß auf das Streckungswachstum der Sproßglieder einer Pflanze ausübt, liegt

es nahe, an hormonale Zusammenhänge zu denken. Das Juglon ist ein α-Naphtochinonderivat, also ein chemischer Körper, der sich vom Naphtalin herleiten läßt. Nun kennen wir aus der Gruppe der Naphtalinabkömmlinge eine ganze Reihe von Stoffen, für die eine höchst aktive Wuchsstoffwirkung nachgewiesen werden konnte (z. B. α-Naphtyl-Essigsäure, β-Naphtylessigsäure u. a. m.). Auch in unserem Falle der unterschiedlichen Wirksamkeit von Juglon und Regentraufe der Juglandaceen auf das Streckungswachstum der Tomatensprosse läßt sich ein solcher Zusammenhang vermuten. Da es bei der Anlage der einleitenden Untersuchung nur darauf ankommt, einen ersten Anhaltspunkt für die Richtigkeit dieser Vermutung zu erhalten, wurde die Fähigkeit abgeschnittener Tomatensprosse, in Wasser nach wenigen Tagen Adventivwurzeln auszubilden, als geeignetes Testverfahren ausgewählt.

Die Adventivwurzelbildung ist nach unseren heutigen Kenntnissen in erster Linie abhängig von dem Vorhandensein einer optimalen Wuchsstoffanreicherung in dem betreffenden Stengelteil. Der Hauptbildungsort der Wuchsstoffe liegt im jugendlichen Blatt, von ihm aus wandern Wuchsstoffströme basalwärts in den Stengel und steuern hier neben anderen Prozessen die Adventivwurzelbildung (Literatur bei Söding 1952). Bringe ich nun mit dem Benetzungswasser auf die Epidermis eines Tomatenblattes eine chemische Verbindung, die nach ihrem Eintritt in die Gewebe des Blattes in irgendeiner Weise in die Wuchsstofferzeugung oder Leitung einzugreifen vermag, so werde ich erwarten dürfen, daß sich dieser Vorgang basalwärts bis in die Zone der Adventivwurzelbildung hin bemerkbar machen wird.

Über diese mit dem „Rhizokalinkomplex" zusammenhängenden Fragen haben uns die Untersuchungen Libberts (1955/56) an *Pisum* Aufklärung gebracht. So zeigen die verschiedenen Altersstufen der Internodien eine verschiedene Bereitschaft, Adventivwurzeln zu bilden. Auch „innerhalb eines Internodiums haben die Teile in der Nähe der beiden Knoten eine größere Bewurzelungstendenz als der mittlere" (A. Lang, Ref. d. Arbeit Libberts 1957).

Methodisches. Zu den Versuchen wurde die Tomatensorte „Haubners Vollendung" benutzt, die sich durch eine große Gleichmäßigkeit im Aufwuchs einer Population auszeichnet. Bei Versuchsbeginn waren die Pflanzen vier Wochen alt. Eine Versuchsreihe umfaßte jeweils 30 Pflanzen. Die Versuchspflanzen wurden mit einer Rasierklinge oberhalb der Kotyledonen dekapitiert, das unterste Folgeblatt entfernt und der Stengel in Höhe des zweiten Blattes mit einer Wattelage umwickelt; danach kamen die abgeschnittenen Sprosse in Erlenmeyerkolben, die mit der jeweiligen Versuchslösung gefüllt waren. Im allgemeinen tauchten zwei Internodien des Stengels in die Lösung ein. Die Versuche standen in Blechkästen in einem Gewächshaus. Ähnlich wie in den Quarzsandkulturen wurden, wenn nichts anderes angegeben ist, drei Gruppen gebildet.

1. Kontroll/Sprosse, in Leitungswasser stehend, wurden täglich zweimal mit Leitungswasser besprüht.

2. Juglon/Stengel. Die Sprosse standen in einer mit Leitungswasser bereiteten Juglonlösung (1 oder 2 mg im Liter). Besprühung mit Leitungswasser wie die Kontrollen.

3. Juglon/Blatt. Die Sprosse standen wie die Kontrollen in Leitungswasser und wurden täglich morgens und abends mit einer Juglonlösung (1 oder 2 mg im Liter) mit einem Zerstäuber besprüht.

Das verwendete Leitungswasser zeichnete sich durch einen hohen Härtegrad aus (p_H 6,8—7,1). Sowie an der Rinde der eintauchenden Internodien die ersten Schwellungen bzw. Durchbrüche der „Internodialwurzeln" zu beobachten waren, wurden ihre Anzahl und Lage täglich gezählt. Am 9. oder 10. Tag nach Versuchsbeginn wurde der Versuch abgebrochen und hierbei eine Schlußzählung vorgenommen, wobei außer der erreichten Anzahl auch die Länge der Wurzeln mit der Schublehre gemessen wurde. An der Basis des untersten Internodiums bildet sich nach 5 bis 6 Tagen unmittelbar über der Schnittfläche als Folge der Wundeinwirkung ein Ringwulst an der Stengelrinde, aus dem dann in großer Zahl Wurzeln hervortreiben. Da diese Wurzeln feingliedrig sind, bilden sie einen nach unten in das Wasser herabhängenden Kranz. Zur leichteren Kenntlichmachung in den Protokollen sind sie als „Kranzwurzel" bezeichnet worden.

Die Versuchspflanzen (Juglon/Stengel), deren unterste zwei Internodien der Einwirkung einer schwachen Juglonlösung ausgesetzt waren, bilden im Vergleich zu den Kontrollpflanzen nur 60% der Adventivwurzeln aus. Hierbei ist der prozentuale Rückgang bei den „Internodialwurzeln" zu buchen (vgl. Tabelle 10: oberes Internodium 43%, unteres 34%). Ein Blick auf die der Schnittfläche und damit der Jugloneinwirkung am nächsten gelegenen „Kranzwurzeln" (99%) macht es deutlich, daß bei den hier zur Anwendung gekommenen schwachen Konzentrationen von keiner Giftwirkung des Juglons, im Sinne eines Plasmagiftes, gesprochen werden kann.

Tabelle 10. *Tomatenversuch 169*

Angesetzt 2. 8. 57; Schlußzählung 12. 8. 57; Juglonlösung 2 mg im Liter Leitungswasser.

	Adventivwurzeln (Anzahl)			Insgesamt
	oberes Internodium	unteres Internodium	Basis (Kranzwurzeln)	
Kontrolle . . .	252 (100%)	205 (100%)	238 (100%)	695 (100%)
Juglon/Stengel.	109 (43%)	71 (34%)	235 (99%)	415 (60%)
Juglon/Blatt .	199 (79%)	215 (105%)	291 (122%)	705 (101%)

Länge der „Kranzwurzeln" (Basis der Stengel):

Kontrolle . . .	12,5 mm (100%)
Juglon/Stengel.	22,1 mm (178%)
Juglon/Blatt .	15,0 mm (120%)

Die Besprühung mit einer Juglonlösung, bei der die Stengelschnittfläche nur mit reinem Leitungswasser in Berührung kam, führt zwar zu einer gleich großen Gesamtzahl der zur Ausbildung kommenden Adventivwurzeln wie bei den Kontrollen, es ist aber eine Verschiebung

der prozentualen Anteile an beiden Internodien nach der Basis des Stengels hin unverkennbar.

Vergleichen wir die in den drei Versuchsgruppen (Tabelle 10 unten) erreichten Längen der „Kranzwurzeln", so stellen wir bei den Wurzellängen der mit Juglon behandelten Pflanzen eine erhebliche Zunahme der Wurzellängen fest. Gerade das Auftreten eines vermehrten Streckungswachstums bei den „Kranzwurzeln" läßt den starken prozentualen Rückgang in der Ausbildung von „Internodialwurzeln" bei den mit Juglon behandelten Sprossen in einem anderen Lichte erscheinen. Die Annahme, daß es sich hierbei um eine Beeinflussung der hormonalen Vorgänge in der Sproßbasis durch das Juglon handelt, hat ein hohes Maß an Wahrscheinlichkeit für sich.

Im Laufe des Sommers sind diese Versuche zehnmal wiederholt worden, so daß auf jede Behandlungsgruppe in der Versuchsreihe einhundert Versuchspflanzen entfielen. Die Tendenz der von der Basis her mit Juglon behandelten Tomatensprosse ist in allen Versuchen die gleiche geblieben. Die erreichten Prozentzahlen unterlagen durch die unterschiedlichen Witterungsverhältnisse der zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Versuchsreihen erheblichen Schwankungen. — Bei den mit Juglon besprühten Pflanzen (Juglon/Blatt) waren unter den zehn

Tabelle 11. *Tomatenversuch 166*

Angesetzt 25. 7. 57; Schlußzählung: 3. 8. 57; Juglonlösung 2 mg im Liter Leitungswasser.

	Adventivwurzeln (Anzahl)			Insgesamt
	oberes Internodium	unteres Internodium	Basis (Kranzwurzeln)	
Kontrolle . . .	109 (100%)	378 (100%)	359 (100%)	846 (100%)
Juglon/Stengel.	92 (84%)	226 (60%)	322 (90%)	640 (75%)
Juglon/Blatt .	183 (168%)	335 (89%)	332 (92%)	850 (100%)

Länge der „Kranzwurzeln" (Basis des Stengels):

Kontrolle . . .	28,5 mm (100%)
Juglon/Stengel.	38,5 mm (135%)
Juglon/Blatt .	28,2 mm (99%)

Wiederholungen zwei, bei denen gegenüber den Kontrollen im oberen Internodium eine Vermehrung der neugebildeten Adventivwurzeln eingetreten war (Tabelle 11).

Das tägliche zweimalige Besprühen mit einer künstlich hergestellten Schwarznußtraufe[1] führt zu einem anders gelagerten Zahlenergebnis

[1] Ein Vergleich der bei einem Regen unter einem Nußbaum aufgefangenen Traufe und einer künstlich mit Regenwasser oder Aqua bidest. hergestellten ergab keinen Unterschied in der Wirkung auf die Tomatenpflanzen. Täglich um 16 Uhr wurden 100 g frisch vom Baum gepflückte Schwarznußblätter mit ihren Spreiten in 1 Liter Aqua bidest. untergetaucht und die Lösung nach 30 Minuten abgegossen und filtriert. Gerbstoff, Juglongehalt, p_H- und rh-Wert wurden ermittelt.

der Adventivwurzelbildung als bei den Juglonbestäubungen. Eine Zerstäubung des Juglons auf die Oberfläche des Tomatenblattes hatte *keine* Änderung der Gesamtzahl der zur Ausbildung kommenden Adventivwurzeln, gemessen an den Kontrollen, zur Folge gehabt. Anders wirkt die Schwarznußtraufe, sie führte stets zu einem merklichen Rückgang der Wurzelbildung, der zwischen 19 und 41% schwankte.

Tabelle 12. *Tomaten-Besprühungsversuch 168*

Künstlich hergestellte Schwarznußtraufe; angesetzt 1. 8. 57; Schlußzählung 9. 8. 57.

	Adventivwurzeln (Anzahl)			Insgesamt
	oberes Internodium	unteres Internodium	Basis (Kranzwurzeln)	
Kontrolle . . .	441 (100%)	175 (100%)	190 (100%)	806 (100%)
Schwarznußtraufe . . .	201 (45%)	151 (86%)	125 (66%)	477 (59%)

Länge der „Kranzwurzeln" (Basis des Stengels) (Durchschnitt):

Kontrolle . . . 16,4 mm (100%)
Schwarznußtraufe . . . 8,8 mm (54%)

Tabelle 13. *Tomaten-Besprühungsversuch 175*

Schwarznußtraufe (künstlich zubereitet); angesetzt: 30. 8. 57; Schlußzählung 9. 9. 57, je 15 Pflanzen.

	Adventivwurzeln (Anzahl)					
	oberes Internodium		unteres Internodium		Basis (Kranzwurzeln)	Insgesamt
	oben	unten	oben	unten		
Kontrolle	26	56	314	287	359	1042
Schwarznußtraufe . . .	6	26	262	229	346	849
Kontrolle = 100% . . .	23%	46%	83%	80%	96%	81%

Länge der „Kranzwurzeln" (Basis des Stengels) (Durchschnitt):

Kontrolle . . . . . 48,3 mm (100%)
Schwarznußtraufe . . . 39,4 mm (81%)

Tabelle 12 gibt eine Versuchsreihe aus dem Hochsommer, Tabelle 13 eine solche aus dem beginnenden Herbst wieder. Auch bei der Benetzung durch die Nußbaumtraufe ist eine prozentuale Verschiebung der in den einzelnen Zonen der Internodien ausgebildeten Wurzeln nach der Basis hin zu beobachten. Eine Ausnahme machen die „Kranzwurzeln". Während beim Juglon ihre Zahl gegenüber den Kontrollen meist höher lag oder geringfügig differierte, machen die „Kranzwurzeln" unter der Einwirkung einer Schwarznußtraufe den prozentualen Rückgang der „Internodialwurzeln" getreulich mit. Ja, dieser Rückgang erstreckt sich sogar auf ihr *Längenwachstum*. Das Streckungswachstum

der „Kranzwurzel" nimmt nach einer Besprühung der Blattoberfläche mit *Juglans*-Blatttraufe ab.

Vergegenwärtigen wir uns den Vorgang noch einmal. Beide, Kontrollen und Traufesprosse, tauchten mit ihren basalen Internodien, durch einen dichten Wattebausch gegen das Eindringen irgendwelcher Sprühtröpfchen wohl verschlossen, in das in den Erlenmeyerkolben vorhandene gleiche Leitungswasser. Die bei der Zerstäubung der Schwarznußtraufe erfolgende Benetzung des Blattes genügt, um unten an der Stengelbasis das Streckungswachstum der dort hervorbrechenden „Kranzwurzeln" sichtbar zu hemmen. Was liegt hier näher, als eine Einflußnahme der Traufenstoffe auf die aus dem Blatt in den Stengel abströmenden Wuchsstoffe zu vermuten?

Den Nachweis, daß Epidermen der Tomate den Wuchsstoff von außen her aus dem Benetzungswasser leicht passieren lassen, können wir in überzeugender Weise durch eine Besprühung der Blätter mit einer Lösung von β-Indolylessigsäure (IES) erbringen: Besprüht man eine Anzahl gut entwickelter Tomatenpflanzen mit Lösungen von IES verschiedener Konzentrationen (z. B. 10^{-5}; 10^{-6}; 10^{-7}), so tritt, nach der Stärke der Lösung abgestuft, nach einer bestimmten Zeit überaus kräftige Epinastie der Blätter auf. An den zuvor fast waagerecht ausgebreiteten Blattspreiten biegen sich die Blattspitzen nach unten durch. Bei der höchsten Konzentration hat sich die Blattmittelrippe bereits nach 90 Minuten nach unten soweit eingekrümmt, daß die Blattspitze die Basis des eigenen Blattstieles berührte. Das hierbei zu beobachtende erhöhte Streckungswachstum der Oberseite ist auf die Wuchsstoffzuführung von außen her durch die Epidermen zurückzuführen. Söding (1952, S. 203) drückt die Relation Wuchsstoffkonzentration—Streckungswachstum—Epinastie folgendermaßen aus: „Wie bereits früher geschildert (S. 118), wird aber die Epinastie bei größeren Wuchsstoffmengen gewissermaßen eingeschaltet."

Was geschieht nun aber, wenn nach einem Wuchsstoffbad der Stengelbasis oder der Besprühung eines abgeschnittenen Tomatensprosses mit β-Indolylessigsäure Juglon oder eine *Juglans*-Traufe von der Blattoberfläche oder der Stengelbasis her zur Einwirkung gelangt? Wird die zuvor festgestellte Wirkung der β-Indolylessigsäure auf die Adventivwurzelausbildung durch diese Stoffe modifiziert?

Die Antwort darauf geben uns die folgenden Versuche. Geben wir zwanzig abgeschnittenen Tomatenpflanzen durch Einstellen des Stengels in eine IES-Lösung ein Wuchsstoffbad und überführen hernach die eine Hälfte der Sprosse in reines Leitungswasser, wie die Kontrollpflanzen, die andere dagegen in Leitungswasser, dem wir Juglon zugesetzt haben, so wird die durch die Behandlung mit IES hervorgerufene Vermehrung der Adventivwurzelbildung durch das Juglon stark gebremst (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 14. *Tomatenversuch 163*

Angesetzt 19. 6. 57; Schlußzählung 28. 6. 57; Gruppe I: Kontrolle in Leitungswasser; Gruppe II: 48 Std. Wuchsstoffbad IES 17,5 mg/Liter; danach in Leitungswasser; Gruppe III: 48 Std. Wuchsstoffbad IES 17.5 mg/Liter, unter Zusatz von 2 mg Juglon/Liter. Anschließend Leitungswasser mit 2 mg Juglon/Liter.

	Längen der Adventivwurzeln in mm									Insgesamt
	90	80	70	60	50	40	30	20	10	
I. Kontrolle Anzahl	36	3	5	13	7	18	90	126	298	596 (100%)
II. IES „	4					30	101	67	1054	1256 (211%)
III. IES/Juglon Anzahl							19	22	397	438 (73%)

Die Sprosse der Gruppe III (IES/Juglon), die dasselbe IES-Bad erhalten haben wie die der Gruppe II, wiesen nur 73% der von den Kontrollen gebildeten Wurzeln auf, während das nicht vom Juglon gestörte Wuchsstoffbad eine Vermehrung auf 211% zur Folge hatte! Betrachten wir einmal die von den einzelnen Adventivwurzeln erreichten Längen, so tritt das in dem Rückgang der Gesamtzahl enthaltene Ergebnis noch stärker hervor. Ein IES-Bad verändert den normalen Ablauf der Adventivwurzelbildung, was in dem Auftreten einer „Wurzelbrut" zum Ausdruck kommt (vgl. Tabelle 14, Gruppe II). Die längeren Internodialwurzeln treten zurück gegenüber einer Unzahl von kurzen Würzelchen. Das Juglon stört diesen Vorgang so gründlich, daß nur noch ein Drittel (Tabelle 14, Gruppe III) der Wurzeln gegenüber der IES-Gruppe zur Ausbildung gelangt. Verändert man die Konzentration und die Einwirkungsdauer der IES auf die Hälfte, so ähneln die drei Versuchsgruppen einander wieder mehr in der Verteilung der Adventivwurzeln (vgl. Tabelle 15), der hemmende Einfluß des Juglons gegenüber der Wirkung der IES tritt jedoch auch hier klar zutage. In Gegenwart des Juglons bewirkt das IES-Bad am oberen Internodium nur eine Vermehrung von 26% gegen 78% der juglonfreien Behandlung (Tabelle 15, Gruppe II und III).

Noch krasser tritt die Einwirkung des Juglons auf die gleichzeitige Verabfolgung von IES in Erscheinung, wenn statt des Wuchsstoffbades der Sproßbasen die β-Indolylessigsäure auf die Blätter gesprüht wird. Während bei einer alleinigen Behandlung der Sproßbasis mit einer Juglonlösung der Rückgang sich nur bei den Internodialwurzeln bemerkbar machte, erstreckt sich nach einer gleichzeitigen Besprühung der Blätter mit IES der Rückgang der Adventivwurzelbildung auch auf die „Kranzwurzeln" (vgl. Tabelle 16).

Hatte eine *alleinige* Juglonbehandlung eine Vermehrung des Streckungswachstums der „Kranzwurzeln" zur Folge (vgl. Tabelle 16), so tritt nach der IES-Besprühung im Juglon eine Verminderung des Streckungswachstums gegenüber den Kontrollen ein.

Tabelle 15. *Tomatenversuch 167*

Angesetzt 25. 7. 57; Schlußzählung 5. 8. 57; Gruppe I: Kontrolle in Leitungswasser; Gruppe II: 24 Std. Wuchsstoffbad 10 mg IES/L, danach in Leitungswasser mit 2 mg Juglon im Liter; Gruppe III: 24 Std. Wuchsstoffbad 10 mg IES/L, danach Leitungswasser.

	Adventivwurzeln (Anzahl)			Insgesamt
	oberes Internodium	unteres Internodium	Basis (Kranzwurzeln)	
I. Kontrolle .	244 (100%)	469 (100%)	380 (100%)	1093 (100%)
II. IES/Juglon	309 (126%)	319 (68%)	267 (70%)	895 (81%)
III. IES . . .	434 (178%)	461 (98%)	319 (84%)	1214 (111%)

Länge der „Kranzwurzeln" (Stengelbasis):

Kontrolle . . . 38,6 mm (100%)
IES/Juglon . . 31,2 mm (84%)
IES . . . . . 29,7 mm (77%)

Tabelle 16. *Tomatenversuch 172*

Angesetzt: 20. 8. 57; Schlußzählung 29. 8. 57. Gruppe I: Sprosse stehen in Leitungswasser, Besprühung am 20. 8. mit Aqua bidest. Gruppe II: Sprosse stehen in Leitungswasser, dem 1,5 mg Juglon/L zugesetzt wurde. Besprühung am 20. 8. mit einer IES-Lösung, die 17,5 mg im Liter enthielt. Weitere Besprühung unterblieb.

	Adventivwurzeln (Anzahl)			Insgesamt
	Internodienteil		Basis	
	oberer	unterer		
I. Kontrolle .	167 (100%)	174 (100%)	305 (100%)	646 (100%)
II. Besprühung mit IES in Juglon stehend . . .	60 (36%)	110 (63%)	201 (66%)	371 (57%)

Länge der „Kranzwurzeln" (Stengelbasis);

I. Kontrolle . 21,2 mm (100%)
II. Besprühung mit IES in Juglon . . 17,4 mm (82%)

Diskussion der Ergebnisse

Die Ursache für die allelopathische Beeinflussung, die die Juglandaceen auf eine ganze Reihe von Pflanzen ausüben, ist bisher vornehmlich in Wurzelausscheidungen der Nußbäume gesucht worden. Unsere Versuche mit Mischkulturen (Schwarznuß/Tomate) machen aber deutlich, daß das Laubblatt und die männlichen Kätzchen als die Abgabeorte der Hemmstoffe zu betrachten sind. Das Laubblatt wirkt, solange es seine Funktion am Zweige ausübt, durch die Abscheidungen in der Traufe. Nach seinem Abwurf führt es langlebige Hemmstoffe dem Boden zu. Solange wir eine Traufenbildung der oberirdischen Organe des Nußbaumes unterbinden, zeigt eine Tomatenpflanze, die

mit dem Schwarznußbaum in einer Quarzsandkultur zusammenwächst, keinerlei Wachstumsschädigungen. Wären die *Juglans*-Wurzeln imstande, ihrerseits hemmende Stoffe auszuscheiden, so müßten diese in einer Nährlösung, in der ein Schwarznußbaum längere Zeit gewachsen ist, aufzeigbar sein. Eine von einem Schwarznußbäumchen besiedelt gewesene Nährlösung ruft bei Tomaten, die nachher in dieser Lösung in Quarzsandkulturen gezogen werden, im Gegenteil eine Wachstumsförderung hervor. Angesichts dieser Befunde kann die von COOK 1921 geäußerte Vermutung einer Juglonabsonderung durch die Nußbaumwurzel nicht stichhaltig sein. Sollten sich seine Beobachtungen, daß das die Tomatenpflanzen schädigende Agens immer vom Boden ausging, nicht so erklären lassen, daß die von den abgefallenen Laubblättern dem Boden zugeführten Stoffe dafür verantwortlich zu machen sind? (Es wäre auch daran zu denken, daß durch Kulturarbeiten verletzte und zerstörte Nußbaumwurzeln sich anders verhalten.) In welch erheblichem Maße Hemmstoffe von abgeworfenen grünen Organen der Nußbäume abgegeben werden, zeigen in überzeugender Weise unsere „Kätzchenversuche". Die grünen Schalen der Perikarpien sind von noch stärkerer Wirkung als die Kätzchen, ihr Abwurf fällt aber in eine Zeit, in der die Tomate ihre Vegetationszeit bei uns im Freiland bereits beendet hat.

Welche Veränderungen im Aussehen der Tomatenpflanze können wir als symptomatisch für eine von den *Juglans*-Arten ausgehende Wachstumsbeeinflussung ansehen? Das auffälligste Anzeichen ist zweifellos eine starke Epinastie der Blätter und das frühzeitige Vergilben der Kotyledonen und unteren Folgeblätter. Dieses Vergilben der Blätter hat wohl zu den in den meisten Arbeiten aufgeführten Angaben über ein „Welken" der vom Nußbaum geschädigten Tomatenpflanzen geführt. Man wird bei dieser Sinngebung des Wortes „Welken" an die von *Fusarien*-Arten erzeugte „Welke" erinnert. Bei diesem „Welken" spielen Chinone[1] und ihre Derivate eine Rolle. Hier könnte eine Verbindung zu einer analogen Wirkung des Juglons bestehen.

Das Juglon (in der Pflanze als Glykosid des Di-Hydrojuglon vorliegend) ist im Stoffwechsel des Nußbaumes so vorherrschend, daß es in allen einschlägigen Arbeiten als der toxigene Stoff der Wachstumsschädigung der Tomatenpflanzen angesprochen worden ist. MASSEY (1925) hatte bei seinem Zusatz von Nußbaumrinde *(Juglans nigra)* zu einer in Nährlösung stehenden Tomatenpflanze bereits nach zwei Tagen ein Welken und Zugrundegehen beobachtet. Die seiner Arbeit beigegebene Photographie zeigt indessen, daß die Lösung tintenschwarz von dem Rindenauszug geworden war. Die Schwärze der Lösung deutet

[1] Das von Fusarien gebildete Ektotoxin „Javanicin" ist ein Naphtochinon (Bruttoformel $C_{15}H_{14}O_6$), vgl. GÄUMANN 1951, S. 333. Bruttoformel des Juglon $C_{10}H_6O_3$.

außer auf die Anwesenheit von großen Mengen von Oxydasen auch auf eine hohe Konzentration des verwendeten Rindenauszuges hin. Der Bast führt in den Vacuolen seiner Gewebe reichlich Juglon und Gerbstoffe. Für die Beurteilung der Wirksamkeit des Juglons dritten Pflanzen gegenüber können aber nur *die* Konzentrationen als maßgebend betrachtet werden, die von den Organen des Nußbaumes *natürlicherweise abgegeben werden.* In höheren Konzentrationen liegt das Juglon nur in den abgeworfenen männlichen Kätzchen und grünen Schalen des Perikarps vor. In beiden sinkt der Juglongehalt beim Eintrocknen rapid ab. Die Cuticula des Laubblattes passieren aber nur geringe Mengen, die in der Blatttraufe als schwache Juglonlösung auf die darunterstehenden Pflanzen träufeln; wobei es noch nicht geklärt ist, inwieweit es in Form anderer Derivate in der Traufe enthalten ist.

Wie aus dem Kurvenverlauf des Traufenrückstandes während des Sommers 1957 zu ersehen war, hatte die Schwarznuß hauptsächlich im Frühsommer nachweisbare Mengen von Juglon aufzuweisen. Rein mengenmäßig tritt das Juglon im Traufenrückstand weit hinter den Gerbstoffen zurück. Aber diese schwachen Juglonlösungen sind imstande, auf das Wachstum der Tomate einzuwirken. Schwache Lösungen synthetischen Juglons, durch eine Blattbesprühung oder von der Wurzel her geboten, hatten außer einer Verminderung des erzeugten Frischgewichtes eine wichtige Nebenwirkung des Juglons offenbart. Das Streckungswachstum der Sproßglieder wird durch Juglon gehemmt. Gleichzeitig tritt bei einer Gabe von der Wurzel her eine deutliche Vermehrung der Seitenwurzelbildung auf. Die Blatttraufe der Juglans-Arten hatte bei einer täglichen Benetzung der Tomatenblätter zwar eine verminderte Anzahl von Sproßinternodien zur Folge, das einzelne Internodium wies aber eine Streckung gegenüber den Kontrollpflanzen auf.

Wenn man die Verteilung der Adventivwurzelbildung an den untersten Internodien einer dekapitierten jungen Tomatenpflanze in Leitungswasser als Norm ansieht, kann man durch Zuführung der verschiedenen Komponenten der Nußbaumtraufe auf das Blatt oder an die Stengelbasis nachweisen, daß sowohl das Juglon als auch die komplexe Traufe einer starken Einflußnahme auf den Prozeß der Wurzelbildung fähig sind. Während das Juglon die „Internodialwurzeln" auf die Hälfte herabsetzt, beeinflußt es die Zahl der unmittelbar über der Schnittfläche gebildeten „Kranzwurzeln" im positiven Sinne und löst bei allen Adventivwurzeln ein vermehrtes Streckungswachstum aus. Die auf die Tomatenblätter gesprühte Traufe hat eine Streckung der „Kranzwurzeln" nicht im Gefolge. Eine Besprühung der Tomatensprosse mit einer IES-Lösung oder das Baden der Stengelbasis mit einer auf die Adventivwurzelbildung stimulierend wirkenden IES-Lösung wird durch die Anwesenheit des Juglons stark herabgesetzt oder ganz sistiert. Hierbei wird stillschweigend vorausgesetzt, daß alle verwendeten

Konzentrationen unter der Schädigungsgrenze bleiben (für Juglon 2,5 mg im Liter).

Bei dem Versuch, die oben geschilderten Erscheinungen einzuordnen, wird man sich an ähnliche Vorgänge bei den Welketoxinen erinnern müssen (vgl. GÄUMANN u. JAAG 1947). — Zwei indische Forscher, KALYANASUNDRAM u. LAKSMINARAYANAN (1935) haben darauf hingewiesen, daß stark verdünnte Kulturfiltrate von *Fusarium vasinfectum* an abgeschnittenen Baumwollsprossen keine Welkesymptome hervorrufen, sondern die Sprosse zur Bildung von Adventivwurzeln anregen. Es ist durchaus möglich, daß die Wirkung der α-Naphtochinonderivate der *Juglans*-Arten in ähnliche Richtung tendieren. Mit der Veränderung der Blattausscheidungen des Tomatenblattes unter dem Einfluß von Welketoxinen hat sich LINSKENS (1955) sehr eingehend beschäftigt. Bei der von *Fusarium lycopersici* erzeugten „Tomatenwelke" konnte er zeigen, daß die Wirkung der Welketoxine von einer Veränderung der Plasmagrenzschichten (Permeabilitätsänderung) der Tomatenpflanze ausgeht. „Schon eine geringe Schädigung der Grenzschichtenpermeabilität muß daher in der Rekretion ihren Niederschlag finden" (LINSKENS 1955 S. 89). Diese Wechselwirkung zwischen Welketoxin und Rekretion berührt auch die hier interessierende Frage nach der Einwirkungsweise der Blatttraufe des Nußbaumes auf die Blattoberfläche des Tomatenblattes. Hierbei wäre es wünschenswert, Anhaltspunkte für das Verhalten der Ektodesmen diesen Traufenstoffen gegenüber zu erhalten, sofern nicht die auf begründeten Verdacht hin als „Taudrüsen" angesprochenen kleinen Drüsenhaare mit der zur Oberfläche zurückgebogenen „Mittelzelle" doch die Einfalltore des Traufenwassers in die Epidermis der Oberflächen der Blattnerven darstellten (vgl. Abb. 15). Eine ins einzelne gehende Erklärung des Zustandekommens des Symptoms der Epinastie der Tomatenblätter unter dem Einfluß der Nußtraufe können wir noch nicht geben[1]. Reine Juglonlösungen allein vermögen bei der Besprühung der Blätter das Schädigungsbild nicht zu erzeugen. Es müssen noch andere Komponenten der Blatttraufe des Nußbaumes daran beteiligt sein.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Mischkulturen von Schwarznuß (*Juglans nigra* L.) und Tomaten zeigten bei freier Regeneinwirkung eine Beeinträchtigung des Wachstums der Tomatenpflanzen gegenüber den Kontrollen. Schädigungssymptome sind: starke Epinastie der Blätter, frühzeitiges Vergilben der unteren Blätter.

2. Diese Beeinträchtigung des Wachstums der Tomate unterblieb, wenn die Kulturen unter Glas standen, so daß die Bildung einer Regen-

[1] Eine mit Juglondämpfen (das Juglon ist im Wasserdampf flüchtig) geschwängerte Atmosphäre löst allerdings Epinastie der Tomatenblätter aus.

traufe ausgeschlossen blieb. Derselbe Befund war an Quarzsandkulturen beider Partner festzustellen.

3. Die Verwendung von Nährlösungen, in denen Schwarznußsämlinge herangewachsen waren, zur Aufzucht von Tomaten, führte bei den Tomaten zu einer Wachstumssteigerung gegenüber den Kontrollen. Eine Juglonabgabe durch die Wurzeln von *Juglans nigra* konnte nicht beobachtet werden.

4. Die Abgabe der von den Nußbäumen ausgehenden Hemmstoffe erfolgt in erster Linie durch das Laubblatt (Blatttraufe und abgeworfenes Blatt). Abgeworfene Kätzchen von *Juglans*-Arten haben bei jungen Tomaten und Tabakpflanzen als erste Phase der Einwirkung eine zwölftägige Wachstumsdepression und danach eine Wachstumsförderung zur Folge. Das abgeworfene Laubblatt enthält Hemmstoffe von langanhaltender Wirkung.

5. Die Rückstände der Blatttraufe von *Juglans nigra* und *Juglans regia* wurden während des Sommers 1957 fortlaufend registriert und auf Gerbstoff und Juglongehalt geprüft. Zur Zeit des Blattaustriebes ist die Stoffabgabe der Blätter am höchsten und fällt hernach bis etwa acht Tage vor Beginn des herbstlichen Abgilbens.

6. Tomatensämlinge, die schwachen Lösungen von synthetischem Juglon durch Besprühung ihrer Blätter oder durch Zuführung zur Nährlösung ausgesetzt waren, zeigten eine Herabsetzung des gebildeten Frischgewichtes. Juglon (2 mg im Liter) hat eine Verminderung des Streckungswachstums der Internodien und eine Vermehrung der Seitenwurzelbildung zur Folge.

7. Die Blatttraufe der *Juglans*-Arten führt zu einer Verminderung des Gesamtwachstums. Die Anzahl der zur Ausbildung gekommenen Blätter nahm unter der Traufeneinwirkung ab; die Längen des einzelnen Internodiums dagegen zu.

8. Der Verlauf der Adventivwurzelbildung abgeschnittener Tomatensprosse zeigt sowohl unter der Einwirkung von Blatttraufen der *Juglans*-Arten als auch einzelner ihrer Komponenten gesetzmäßige Veränderungen an, die darauf hindeuten, daß hier eine Beeinflussung des Wuchsstoffkomplexes vorliegt. Das von der Stengelbasis her gebotene Juglon hat eine Herabsetzung der Anzahl der „Internodialwurzeln" auf die Hälfte zur Folge. Die Adventivwurzeln machen unter der Einwirkung schwacher Juglonlösungen ein vermehrtes Streckungswachstum durch. Ein Besprühen der Tomatensprosse mit IES-Lösung sowie ein von der Stengelbasis her verabfolgtes Wuchsstoffbad mit IES werden in ihrer Wirksamkeit auf die Adventivwurzelbildung durch eine nachträgliche Behandlung mit Juglonlösung sistiert.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die großzügige Unterstützung meiner Untersuchungen. Ferner möchte ich den Herren Prof. Dr. SCHANDERL, Prof. Dr. KNICKMANN und Prof. Dr. STELLWAAG-KITTEL für freundlich

gewährte Unterstützung durch Überlassung und Mitbenutzung von Apparaturen meinen herzlichen Dank sagen.

Literatur

Arens, K.: Die kutikuläre Exkretion des Laubblattes. Jb. wiss. Bot. **80**, 248—300 (1934). — Bode, H. R.: Über die Blattausscheidungen des Wermuts und ihre Wirkungen auf andere Pflanzen. Planta (Berl.) **30**, 567—589 (1940). — Cook, M. T.: Wilting caused by walnut trees. Phytopathology **11**, 346 (1921). — Daglish, C., and Frank Wokes: Hydrojuglone and apparent vitamin C in walnuts. Nature (Lond.) **162**, 179—180 (1948). — Davis, E. F.: The toxic principle of Juglans nigra as identified with synthetic juglone and its toxic effect on tomato and alfalfa plants. Amer. J. Bot. **15**, 620—621 (1928). — Engel, H.: Das Verhalten der Blätter bei Benetzung mit Wasser. Jb. wiss. Bot. **88**, 816—861 (1939). — Frey-Wyssling, A.: Die Stoffausscheidung der höheren Pflanzen. In: Monographien aus dem Gesamtgebiet der Physiologie der Pflanzen, Bd. 32. Berlin: Springer 1935. — Gäumann, E.: Pflanzliche Infektionslehre. Basel 1951. — Gäumann, E., u. O. Jaag: Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens. I. Ber. schweiz. bot. Ges. **57**, 3—34, 132—148, 227—241 (1947). — Grümmer, G.: Die gegenseitige Beeinflussung höherer Pflanzen. Allelopathie. Jena: Gustav Fischer 1955. — Hilton, R. J., and D. A. Shaw: Leaf feeding of determinate tomato plants. I. The influence of environment. Canad. J. Agric. Sci. **36**, 27—35 (1956). — Hoffmann-Ostenhof, O.: Ein- und zweiwertige Chinone. In Paech u. Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. III. Berlin: Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Kalyanasundram, R., and K. Lakshminarayanan: Rooting of cut shoots of cottonin culture filtrate of Fusarium vasinfectum. Nature (Lond.) **171**, 1120 (1953). — Lang, W.: Zur Physiologie der Naphtochinone und Gerbstoffe in Pflanzen. Pharm. Zentralh. **80**, 713—716 (1939). Lausberg, Th.: Quantitative Untersuchungen über kutikuläre Exkretion des Laubblattes. Jb. wiss. Bot. **81**, 769—806 (1935). — Lambertz, P.: Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermisaußenwänden. Planta (Berl.) **44**, 147—190 (1954). — Libbert, E.: Untersuchungen über die Physiologie der Adventivwurzelbildung. I. Die Wirkungsweise einiger Komponenten des „Rhizokalinkomplexes". Flora (Jena) **144**, 121—150 (1956). — Linskens, H. F.: Quantitative Bestimmung der Benetzbarkeit von Blattoberflächen. Planta (Berl.) **38**, 591—600 (1950). — Der Einfluß der toxigenen Welke auf die Blattausscheidungen. Phytopath. Z. **23**, 89—103 (1955). — Massey, A. B.: Antagonism of the walnuts (Juglans nigra and Juglans cinerea) in certain plant associations. Phytopathology **15**, 773—785 (1925). — Minden, M. v.: Beiträge zur anatomischen und physiologischen Kenntnis Wasser sezernierender Organe. Bibl. Bot. **1899**, H. 46. — Mothes, K.: Über die Ausscheidung von Solanaceenalkaloiden aus gesunden Blättern. Dtsch. Apoth.-Ztg **53**, 1271—1273 (1938). — Rademacher, B.: Die Bedeutung allelopathischer Erscheinungen in der Pflanzenpathologie. Z. Pflanzenkrkh. **64**, 427—439 (1957). — Schumacher, W.: Über plasmodesmenartige Sturkturen in den Epidermisaußenwänden. Jb. wiss. Bot. **90**, 530—545 (1942). — Schumacher, W., u. W. Halbsguth: Über den Anschluß einiger höherer Parasiten an die Siebröhren der Wirtspflanzen. Jb. wiss. Bot. **87**, 324—355 (1939). — Schumacher, W., u. P. Lambertz: Über die Beziehungen zwischen Stoffaufnahme durch Blattepidermen und der Zahl der Plasmodesmen in den Außenwänden. Planta (Berl.) **47**, 47—52 (1956). — Söding, H.: Die Wuchsstofflehre. Stuttgart: Georg Thieme 1952.

Dr. H. R. Bode, Geisenheim a. Rh., Lehr- u. Forschungsanstalt für Wein-, Obst- u. Gartenbau; Abt. Soziologie der Kulturpflanzen

Planta, Bd. 51, S. 481—510 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Rostock

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ENTWICKLUNG DES EMBRYOS UND DER KEIMPFLANZE VON NUPHAR LUTEUM SMITH*

Von

HERMANN v. GUTTENBERG und ROSEL MÜLLER-SCHRÖDER

Mit 32 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Dezember 1957)

1. Einleitung

Die Entwicklung des Embryosacks und des Embryos der *Nymphaeaceae* wurde mehrfach studiert, besonders auch, um die systematische Stellung dieser Familie zu klären. Gibt es doch Anhaltspunkte dafür, daß ihre Vertreter Mono- und Dikotylenmerkmale in sich vereinigen. Das besondere Interesse bei diesen Untersuchungen galt dabei der Entwicklung der Kotyledonen. Die Meinungen darüber, ob es sich um einen einfachen Kotyledo, der später zweilappig wird, oder um zwei Kotyledonen handelt, gehen auseinander. Die Beobachtungen über die Embryoentwicklung gehen dabei aber über junge Stadien kaum hinaus.

Zunächst wurden umfangreiche Untersuchungen über die Embryoentwicklung von *Nelumbo* durch LYON (1901a, b) angestellt. Er teilt die Entwicklung nach der Form des Embryos in vier Stadien ein:

1. „Spherical stage" ....der Embryo ist rund und ohne Suspensor.
2. „Monocotyledonous stage" ....die Plumula tritt schwach hervor und die Kotyledoanlage umgibt als ringförmiger Wall den Embryo.
3. „Dikotyledonous stage" ....der Kotyledo wird zweilappig.
4. „Mature embryo" ....die Plumula bildet Blätter, die Radicula, der Plumula gegenüber, ist fast immer von kotyledonarem Gewebe umschlossen.

Für die systematische Stellung von *Nelumbo lutea* folgert LYON: "*Nelumbo*, both in its anatomy and embryogeny, conforms to the type of the Monocotyledons and, probably with the other Nymphaeaceae, should be classified in the general vicinity of the Alismaceae." Die große Ähnlichkeit der Nymphaeaceen mit den Alismataceen betont auch LEWIS (1904). Er weist aber darauf hin, daß die Plumula bei den Nymphaeaceen zentral liegt und nicht lateral, wie dieses für Monokotyledonen typisch wäre. Eindeutig zu den Dikotyledonen stellt andererseits CONRAD (1902, 1905) die Nymphaeaceen, da zwei Kotyledonen zwischen sich die Plumula einschließen. Auch YORK (1904) beschäftigte sich mit dem Embryo von *Nelumbo*. Wichtig ist seine Beobachtung, daß die Zygote sich in der Regel transversal teilt und durch Längswände in den Tochterzellen das Oktantenstadium gebildet wird. Es

* Herrn Professor Dr. OTTO RENNER zum 75. Geburtstag gewidmet.

können aber bisweilen auch durch transversale Teilungen drei hintereinander liegende Zellen entstehen, aus denen durch Einschaltung von Längswänden ein dem Oktantenstadium ähnliches Gebilde aus zwölf Zellen entsteht. In beiden Fällen entwickelt sich später ein vielzelliger, sphärischer Embryo, dessen weiteres Wachstum gleichartig verläuft. Auf die unterschiedliche Embryoentwicklung unter den Vertretern der Nymphaeaceen weist auch COOK (1902, 1906) hin. *Nymphaea advena* und *Castalia odorata* zeigen eine Entwicklung, wie sie YORK als Haupttyp für *Nelumbo* beschrieb, bei *Castalia ampla* werden dagegen sechs, bei *C. pubescens* vier und bei *Brasenia purpurea* und *Cabomba pihauiensis* drei bis vier in einer Reihe liegende Zellen gebildet. Während bei *Castalia* die Oktanten durch Längswände in den beiden oberen Zellen gebildet werden, gehen sie bei *Brasenia* und *Cabomba* nur aus der apikalen Zelle hervor, die übrigen Zellen stellen jeweils den Suspensor dar. In allen Fällen soll ein sphärischer Embryo entwickelt werden, der meist einen zweilappigen Kotyledo besitzt. Bei *Nymphaea advena* aber hat dieser die Gestalt einer flachen Schale, die nicht gespalten ist, vom unentwickelten Wurzelpol ausgeht und die Plumula lose einhüllt. Danach glaubt COOK die Nymphaeaceen als abnorme Monokotyle ansehen zu müssen. In einer späteren Arbeit befaßt sich COOK (1909) mit der Ausbildung des Suspensors bei den Nymphaeaceen. Er schreibt, daß nur sehr selten ein normaler Suspensor vorhanden ist, allgemein soll er mehr oder weniger reduziert und schließlich gar nicht mehr entwickelt sein. CONARD fand sogar innerhalb einer Art, und zwar bei *Castalia odorata*, Unterschiede in der Suspensorausbildung. LYON und YORK beobachteten bei *Nelumbo lutea* bisweilen den Rest eines Suspensors, der meist jedoch fehlt.

Nach JOHANSEN (1950) läßt die Embryoentwicklung der Nymphaeaceen einen Vergleich mit dem Astereentyp und hier besonders mit der *Penaea*-Variation zu. Auch die Penaeaceae zeichnen sich durch das Fehlen eines Suspensors aus sowie dadurch, daß der Embryo fast zu gleichen Teilen aus den Abkömmlingen der durch eine erste Querwand entstandenen terminalen und basalen Zelle hervorgeht. Viel auffälliger ist indessen die Übereinstimmung mit *Ceratophyllum submersum*, wie STRASBURGER (1901) hervorhebt. Aus dem Ganzen geht klar hervor, daß die ersten Teilungsschritte der Zygote bei den Nymphaeaceen variieren können, dies aber für die spätere Entwicklung ohne jede Bedeutung ist.

Wie bereits oben erwähnt wurde, brechen die bisherigen Studien über die Embryoentwicklung an Vertretern der Nymphaeaceen schon in frühen Stadien ab. Unsere Untersuchung galt nun besonders der weiteren Entwicklung des Embryos, sowohl des Sproß- als auch des Wurzelvegetationspunktes und darüber hinaus der wachsenden Wurzel.

Die Entwicklung der Vegetationspunkte verläuft bei Mono- und Dikotylen verschieden; es waren also von einer solchen Untersuchung auch Ergebnisse für die Systematik zu erwarten. Für die Radicula von *Nelumbo* bemerkt Lyon (1901b), daß sie fast immer von kotyledonarem Gewebe umschlossen ist und sich nicht weiter entwickelt. Das allgemein sehr frühe Absterben der Primärwurzel bei den Nymphaeaceen ist auch der Grund dafür, daß bis jetzt nur die Bei- oder Seitenwurzeln untersucht wurden. Nicolai (1865) stellt fest, daß sich die Wurzelhaube bei *Nuphar* nach außen allmählich ablöst, bei *Nymphaea* dagegen erhalten bleibt. Tatsächlich sitzt bei alten Wurzeln von *Nuphar* nur noch ein Haubenrest der Spitze auf. Nach Holle (1876) besitzen die Nymphaeaceen *(Nuphar luteum)* ein gemeinsames Meristem für alle Gewebe, also ein „Transversalmeristem".

Umfangreiche Untersuchungen über die Entwicklung der Seitenwurzeln der Nymphaeaceen wurden von van Tieghem (1886) durchgeführt. Er kommt zu dem Ergebnis, daß sich die Wurzelspitzen von *Nuphar luteum*, *Nymphaea alba* und *Victoria regia* wie die von Monokotyledonen verhalten, indem nämlich die Kalyptra eine eigene Initialschicht besitzt. Dagegen soll sich *Nelumbo nucifera* nach dem Bau ihrer Wurzelspitzen den Dikotyledonen anschließen; Kalyptra und Dermatogen hätten hier gemeinsame Initialen.

Conard (1905) und Kroll (1912) geben für die Nymphaeaceen ein transversales Urmeristem in der Wurzelspitze an. Rabbas (1913) dagegen schreibt über die Nymphaeaceen: „Nach meinen — wenn auch heute noch etwas fragmentarischen Untersuchungen — liegen bei den Nymphaeaceen ähnliche Verhältnisse wie bei den Ranunculaceen vor. Nur löst sich bei den Nymphaeaceen die Wurzelhaube alsbald vom eigentlichen Wurzelkörper ab und bleibt nur ganz unten am Wurzelscheitel durch einige Zellen mit ihm in dauernder Verbindung." Die Ranunculaceen verhalten sich nach ihm wie *Brassica*, besitzen also eine dermatogene selbständige Haube („geschlossener Typus"). Wie man sieht, herrscht also eine völlige Verschiedenheit der Meinungen. Eine genaue Untersuchung der Entwicklung des Sproßvegetationspunktes fehlt ganz.

2. Material und Methode

Früchte von *Nuphar luteum* wurden im Herbst 1954 und im Sommer 1955 in den verschiedenen Altersstufen im neuen Botanischen Garten der Universität Rostock und in der Umgebung von Rostock gesammelt. Aus den älteren Samenanlagen mußten die Embryonen mit dem Perisperm herauspräpariert werden, da die feste Samenschale ein Schneiden des ganzen Samens mit dem Mikrotom unmöglich machte. Die kleinen Embryonen liegen am zugespitzten Ende des Samens, vom Endosperm umgeben, unter einem Samendeckel. Das Endosperm sitzt in einer Grube des Perisperms, das den größten Teil des Samens ausfüllt. Eine Entfernung des Endosperms vom Embryo ist nicht ratsam, da der zarte Embryo dabei

zu leicht beschädigt wird. Reife Samen wurden in Petrischalen in Wasser zum Keimen angesetzt. Vorher setzten wir sie zwei bis drei Wochen lang einer Temperatur von $+3^0$ C aus. Bei etwa $+20^0$ C und völliger Dunkelheit bestanden gute Keimbedingungen, durch die wir jedoch frühestens nach einem Monat die gekeimten Samen erhielten. Wenige Tage nach Keimbeginn starben die Primärwurzeln aber schon wieder ab, sie erreichten eine Länge von höchstens 5 mm. Unter den angegebenen Bedingungen keimte nur eine außerordentlich geringe Anzahl der Samen, was mit der verhältnismäßig langen Keimruhe von *Nuphar luteum* zusammenhängen mag. So gibt auch RAUH für Samen von *Nymphaea* an, daß die Keimung erst nach 9 bis 24 Monaten erfolgt. Tatsächlich beobachteten wir, daß nach 6 bis 7 Monaten immer noch neue Samen zu keimen begannen.

Die Beiwurzeln, die wachsenden Primärwurzeln und die herauspräparierten Embryonen wurden nach BOUIN-ALLAN fixiert und anschließend 48 Std gewässert. Über die verschiedenen Alkohol- und Alkohol-Xylol-Stufen und nach Vorfärben mit Eosin überführten wir die Objekte in Paraffin. Am Mikrotom wurden in einer Dicke von 3—7 μ geschnitten. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN. Um die Zellwände deutlicher hervortreten zu lassen, wurde in der Alkohol-Xylol-Stufe mit Lichtgrün gegengefärbt.

Zeichnungen der medianen Längsschnitte wurden mit Hilfe eines Zeichenapparates (Zeiss-Jena) angefertigt. Zum Teil wurden die Längsschnitte fotografiert. Anschließend wurden die Zeichnungen mit den Fotografien und den Originalbildern verglichen und verbessert.

3. Ergebnisse

a) Die Entwicklung des Embryos und der Primärwurzel. Bei der nunmehr zu schildernden Entwicklung des Embryos verwenden wir die Nomenklatur von SOUÈGES. Zunächst teilt sich die befruchtete Eizelle durch eine Querwand in zwei gleich große Zellen, was schon HOFMEISTER (1858) gefunden hatte. Durch zwei sich kreuzende Längswände in jeder Tochterzelle wird das Achtzellstadium erreicht (Abb. 1). Der Embryo besitzt nur diese beiden Etagen, ca und cb, aus denen sich in nachfolgenden Teilungsschritten der gesamte Embryokörper aufbaut. Die Etagengrenze zwischen ca und cb läßt sich in jüngeren Embryonen noch verfolgen, wird aber bald undeutlich.

Die nun folgenden Teilungen gehen nach keiner bestimmten Ordnung vor sich. So zeigt Abb. 2 in einem Abkömmling der Zelle cb die Bildung einer Querwand, während in der Etage ca zunächst eine schiefe Wand angelegt wird. In den nächsten Abbildungen (Abb. 3—6) ist lediglich Zellvermehrung durch Einschaltung von Schräg-, Längs- und Querwänden in beiden Etagen erfolgt.

Alle Embryonen zeigen jedoch in diesen jungen Entwicklungsstadien nachträglich eine Unterteilung sowohl der Etage ca als auch der Etage cb in zwei übereinander liegende Abschnitte. Es wird also hier eine Etagenbildung sozusagen nachgeholt, um „echte" Etagen im Sinne von SOUÈGES handelt es sich nicht. Die aus ca hervorgegangenen Abschnitte wollen wir *l* und *l'* nennen, *cb* bildet die Abschnitte *d* und *f*. Der Abschnitt *l* liefert später den Sproßvegetationspunkt, *l'* den oberen

Teil der Kotyledonen, *l* zeigt vorübergehend eine keilförmige Epiphysenzelle, *d* erzeugt den unteren Teil der Kotyledonen und ein Hypokotyl, das nur durch das Plerom angedeutet ist, *f* bildet die Initialen des Periblems sowie den zentralen Teil der Haube. Im heranwachsenden

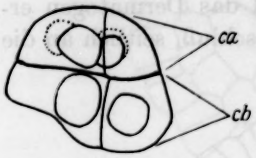


Abb. 1

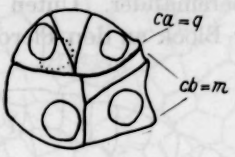


Abb. 2

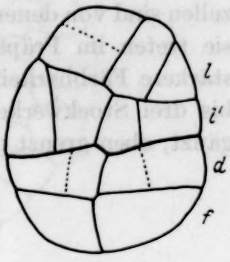


Abb. 3

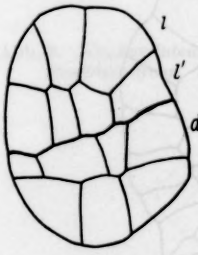


Abb. 4

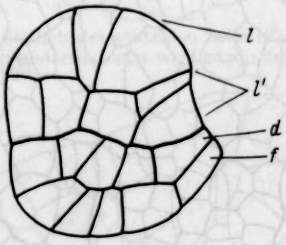


Abb. 5

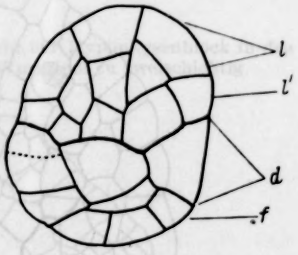


Abb. 6

Abb. 1—6. *Nuphar luteum*. Erste Entwicklung des Embryos. Vgl. den Text

Embryo werden diese Abschnittsgrenzen bald verwischt. Dies zeigt bereits die Abb. 6, hier beginnt sich auch schon eine periphere Zellschicht zu differenzieren.

Der heranwachsende Embryo der Abb. 7 ist noch immer sphärisch. Hier hat sich deutlich ein Dermatogen herausgebildet, das nur den Wurzelpol frei läßt. Dieser wird durch eine Gruppe von Zellen gebildet, die aus dem Abschnitt *f* hervorgeht. Sie liefert später die Periblem-initialen (iec) und den Zentralteil der Wurzelhaube (ico), die Kolumella. In Hinsicht auf seine Bildungsprodukte bezeichnen wir diese Zellgruppe als „Hypophysenblock". Die Etagengrenze zwischen *ca* und *cb* ist im Präparat gut zu verfolgen, dagegen die Grenze *l*, *l'* verwischt.

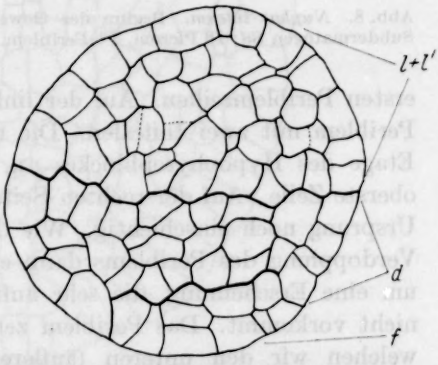


Abb. 7. *Nuphar luteum*. Beginnende Abgliederung des Hypophysenblockes aus *f*

Die folgende Abb. 8 zeigt einen Embryo, der bereits die Anlage des Kotyledonarwulstes erkennen läßt. Über der Hypophyse differenziert sich das Plerom, an dessen Ursprung drei Zellen liegen. Die Pleromzellen sind von denen des übrigen Embryokörpers nur wenig verschieden, sie treten im Präparat aber durch ihre Reihenanordnung und durch stärkere Färbbarkeit hervor. Die Zellen der Hypophyse liegen in zwei bis drei Stockwerken übereinander. Unten wird das Dermatogen ergänzt, oben grenzt dieser Block an den Pleromabschluß, seitlich an die

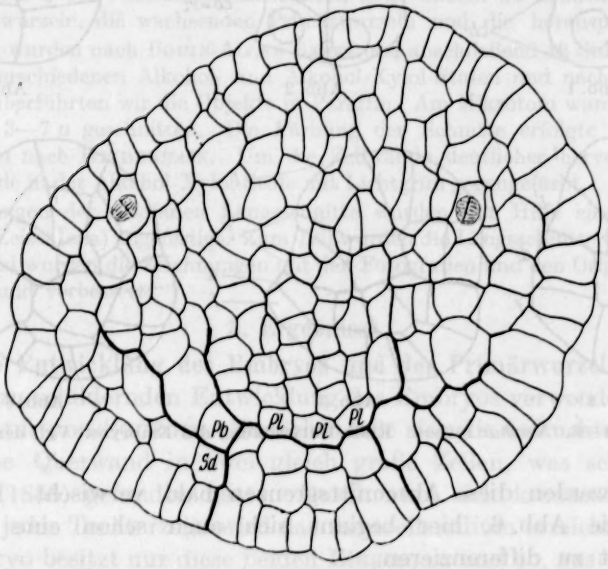


Abb. 8. *Nuphar luteum*. Beginn der Gewebedifferenzierung, links unten erscheint das Subdermatogen *Sd*; *Pl* Plerom, *Pb* Periblem. Seitlich erkennt man die Kotyledonenanlage

ersten Periblemreihen. Auf der linken Seite des Embryos beginnt das Periblem mit zwei Initialen. Die untere schließt sich an die mittlere Etage des Hypophysenblockes an, die obere Reihe grenzt an dessen oberste Zelle. Auf der rechten Seite des Embryos ist das Periblem am Ursprung noch einschichtig. Wie die späteren Bilder zeigen, wird die Verdopplung des Periblems dann eine allseitige. Es handelt sich hier um eine Erscheinung, die sehr auffällt, weil sie in dieser Form sonst nicht vorkommt. Das Periblem zerfällt von da an in zwei Teile, von welchen wir den unteren (äußeren) als Subdermatogen bezeichnen wollen. Wohl macht sich auch sonst eine solche vom Hauptteil des Periblems abweichende Reihe bemerkbar, die dadurch charakterisiert ist, daß sie nur wenige, oft auch keine perikline Aufspaltung mehr zeigt. Aber sonst zweigt sich dieses Subdermatogen erst nachträglich vom übrigen Periblem ab, d. h. es hat mit diesem gemeinsame zentrale Initialen.

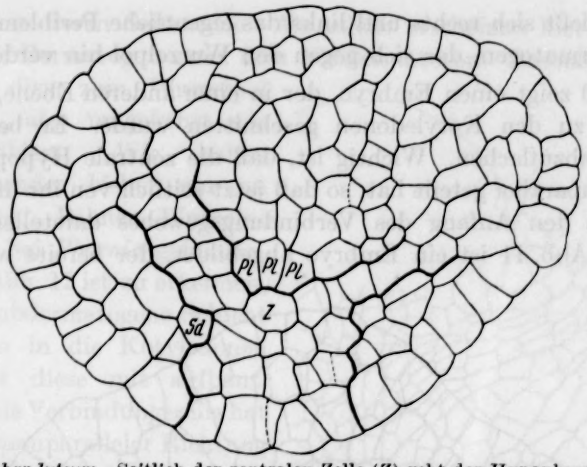


Abb. 9. *Nuphar luteum*. Seitlich der zentralen Zelle (*Z*) geht der Hypophysenblock in das Periblem über. Das Subdermatogen wird gegen den Wurzelpol zu zweischichtig

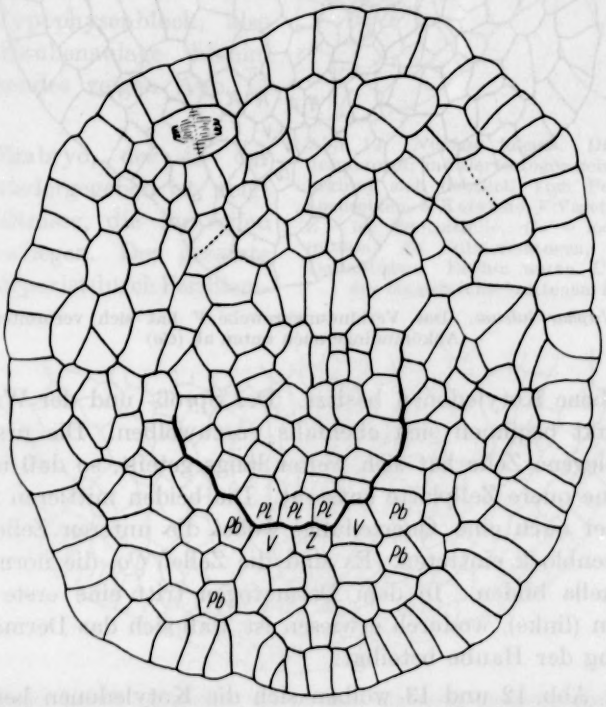


Abb. 10. *Nuphar luteum*. Medianer Schnitt senkrecht zur Kotelydonarebene. Es treten seitlich *Z* Verbindungszellen (*V*) auf. *Pb* primäre Periblemінitialen, *Pl* Pleromінitialen

Beim Embryo der Abb. 9 wölbt sich der Hypophysenblock stark in den Embryokörper vor. Durch geeignete Teilungen hat eine einzelne Zelle der obersten Reihe eine zentrale Lage eingenommen. Seitlich von

dieser schließt sich rechts und links das eigentliche Periblem an, unten das Subdermatogen, das sich gegen den Wurzelpol hin verdoppelt hat.

Abb. 10 zeigt einen Embryo, der in einer anderen Ebene, und zwar senkrecht zu den Kotyledonen geschnitten wurde. Er beginnt sich nunmehr abzuflachen. Wichtig ist, daß die zentrale Hypophysenzelle sich achsenparallel geteilt hat, so daß jetzt seitlich von ihr die Zellen *V* liegen, die den Anfang des Verbindungsgewebes darstellen. In der folgenden Abb. 11 ist ein Embryo abgebildet, der bereits wulstförmig

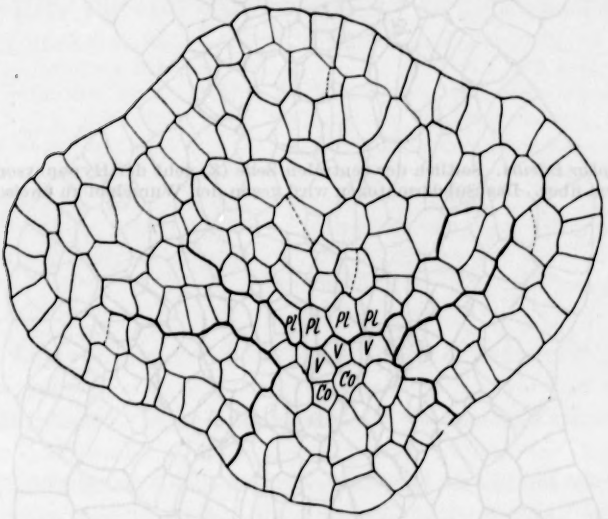


Abb. 11. *Nuphar luteum.* Das Verbindungsgewebe *V* hat sich verbreitert und gibt Abkömmlinge nach unten ab (*Co*)

vorgeschobene Kotyledonen besitzt. Der Sproß- und der Wurzelvegetationspunkt beginnen sich ebenfalls vorzuwölben. Die ursprünglich zentral gelegene Zelle hat sich weiter längs geteilt, so daß unter dem Plerom eine quere Zellplatte entsteht. Die beiden mittleren Zellen erfahren aber auch eine Querteilung, wobei die unteren Zellen in den Hypophysenblock eintreten. Es sind die Zellen *Co*, die normalerweise die Columella bilden. In dem Dermatogen tritt eine erste perikline Teilung ein (links), wodurch erwiesen ist, daß sich das Dermatogen an der Bildung der Haube beteiligt.

In den Abb. 12 und 13 wölben sich die Kotyledonen bereits über den stark vorgeschobenen Vegetationspunkt. Je ein Prokambiumstrang zieht von dem jetzt endgültig formierten Plerom in die Kotyledonen, ein dritter zum Sproßscheitel. Durch erhebliche Verbreiterung des Embryos am Wurzelpol ist der Hypophysenblock flacher geworden. Der zentrale Teil der Wurzelhaube gewinnt dadurch mehr und mehr

Anschluß an deren Seitenteile. Als solche erscheinen hier aufs deutlichste das Dermatogen samt dem Subdermatogen. Besonders wichtig ist, daß dies zum Wurzelpol aufspaltet, also umgekehrt wie das Periblem. Wir haben Entsprechendes bisher nur an keimenden Palmen-Wurzeln, besonders bei *Phoenix* gefunden. Aus der Abb. 12 ist zu erkennen, daß die subdermatogene Schicht nach oben in die Kotyledonen zieht und diese mit aufbaut. Die zentrale Verbindungszelle hat sich in achsenparalleler Richtung gestreckt und anschließend quer geteilt. Sie rückt damit wieder in den Hypophysenblock, also in die Haubenanlage hinein. Entsprechendes zeigen Abb. 15 und 16.

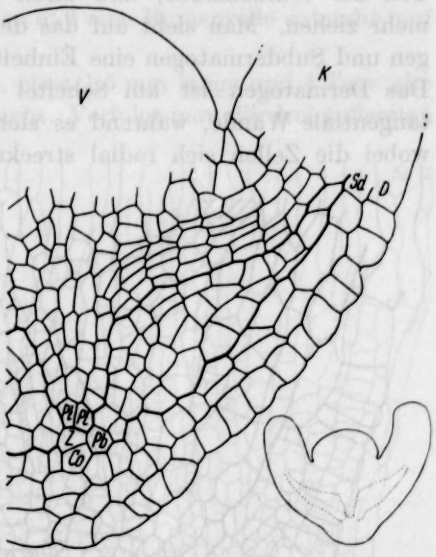


Abb. 12. *Nuphar luteum.* Die aus Subdermatogen und Dermatogen gebildete Haube beginnt sich deutlich vom Periblem (*Pb*) abzusetzen. *K* Kotyledo, *V* Vegetationspunkt, *Z* = iec Zentralzelle, *Co* = ico Columellainitiale, *Sd* Subdermatogen, *D* primäres Dermatogen. Rechts unten Übersichtsbild des längsdurchschnittenen Embryos

Der Embryo, der in der Abb. 13 wiedergegeben ist, zeigt die Verhältnisse, die im reifen Samen vorliegen. Der gesamte Embryokörper ist durch Periblem-

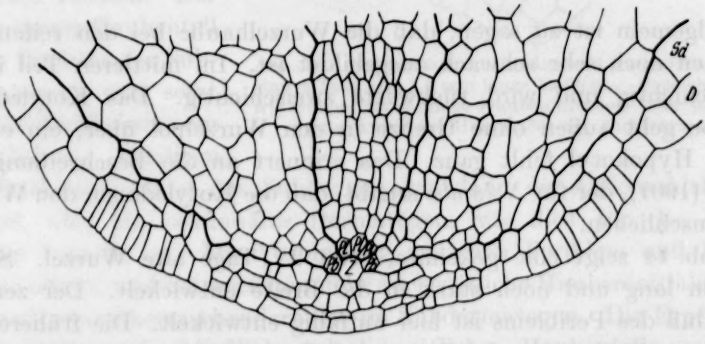


Abb. 13. *Nuphar luteum.* Wurzelpol des fertigen Embryos. Bezeichnungen wie früher

vermehrung stark in die Breite gewachsen. Der zentrale Abschluß des Periblems wird durch eine große Zelle gebildet, die oben an den dreizelligen Pleromabschluß stößt. An diese Zelle grenzt zu beiden Seiten das Periblem in zwei Reihen, es wird durch die charakteristischen

T-Teilungen dann weiter hinten mehrschichtig. Eine Grenze zwischen den unteren Abkömmlingen des Hypophysenblocks, also dem zentralen Teil der Wurzelhaube, und ihren Seitenteilen läßt sich hier nicht mehr ziehen. Man sieht auf das deutlichste, daß nunmehr Dermatogen und Subdermatogen eine Einheit, nämlich die Wurzelhaube bilden. Das Dermatogen ist am Scheitel sehr niedrig, bildet hier wenige tangentiale Wände, während es sich seitlich wiederholt antiklin teilt, wobei die Zellen sich radial strecken.

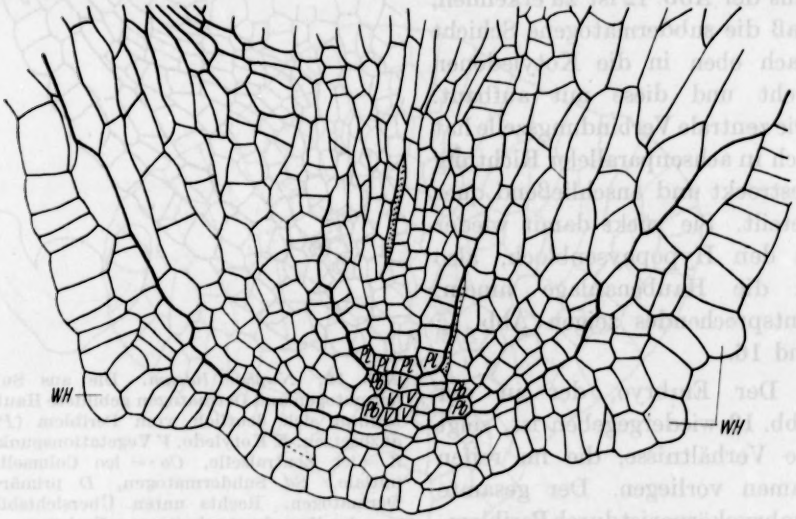


Abb. 14. *Nuphar luteum*. Ausgekeimte $2^1/_2$ Tage alte Wurzel. *WH* Wurzelhaare, *VV* Verbindungsgewebe, sonstige Bezeichnungen wie früher

Allgemein ist zu sagen, daß die Wurzelhaube bei den reifen Embryonen noch sehr schwach ausgebildet ist. Im mittleren Teil ist sie 4—5schichtig und wird rückwärts zweischichtig. Das Kotyledonargewebe geht außen ohne Grenze in den Wurzelpol über, ein eigentliches Hypokotyl fehlt ganz. Das erinnert an die Beschreibung von Lyon (1901), der für *Nelumbo* angibt, daß die Kotyledonen den Wurzelpol einschließen.

Abb. 14 zeigt eine gekeimte, etwa $2^1/_2$ Tage alte Wurzel. Sie ist 0,5 mm lang und noch stark in die Breite entwickelt. Der zentrale Abschluß des Periblems ist hier auffällig entwickelt. Die frühere Verbindungszelle hat durch Quer- und Längsteilungen einen zentralen Zellblock (*VV*) geschaffen, dem sich unten zentrale Zellen der Haube anschließen. Seitlich ergänzt er das Periblem, und auch die Plerominitialen münden in ihn ein. Hinter dem Wurzelpol befindet sich ein emporgehobener Kranz von Papillen, die Wurzelhaaren entsprechen. Vollständig ausgebildete Wurzelhaare konnten wir nur in einem

Ausnahmefall beobachten. Das hängt wohl damit zusammen, daß die Samen in Wasser gekeimt waren, wo nach SCHWARZ (1883) niemals Haare gebildet werden. Im Gegensatz zum Normalfall teilt sich die haarbildende Zelle erst tangential, so daß eine Binnenzelle entsteht, auf der das Haar aufsitzt.

Die in der Abb. 15 dargestellte, etwa 1,5 mm lange und 4 Tage alte Wurzel zeigt einen deutlichen Zuwachs. Verfolgt man die drei äußersten Reihen der Haube von der Spitze rückwärts, so laufen sie schließlich in einer einzigen Reihe aus, die sich auf der linken Seite bereits ablöst und weiter rückwärts verlorengeht. Dieser Anteil ist also aus dem primären Dermatogen entstanden. Das ist aber das typische Verhalten der Monokotylen und kommt bei Dikotylen nirgends vor. Die Abbildung zeigt, daß schließlich doch reichlichere perikline Teilungen auch im Dermatogen auftreten können. Der zweite innere Haubenteil ist ein Produkt des Subdermatogens und setzt sich aufs deutlichste vom eigentlichen Periblem ab. Rückwärts bildet das Subdermatogen dann die Außenschicht der Wurzel, also ein sekundäres Dermatogen, wie dies für die Monokotylen typisch ist. Die Verbindung zwischen Periblem und Haube ist eine offene, und es treten nunmehr auch seitliche Haubeninitialen (*Hi*) auf, und zwar überraschenderweise im Subdermatogen. Die Ergänzung des zentralen und schließlich auch des seitlichen Haubenteils sowie des Periblems wurde von den Verbindungszellen und ihren seitlichen Abkömmlingen übernommen. Die zentral zur Haube abgeschobenen Deszendenten beginnen mit der Bildung einer Art „Columella". Seitlich entstehen dabei knieförmige Bögen, wie sie von uns früher bei Dikotyledonen, aber auch schon bei *Allium* gefunden wurden.

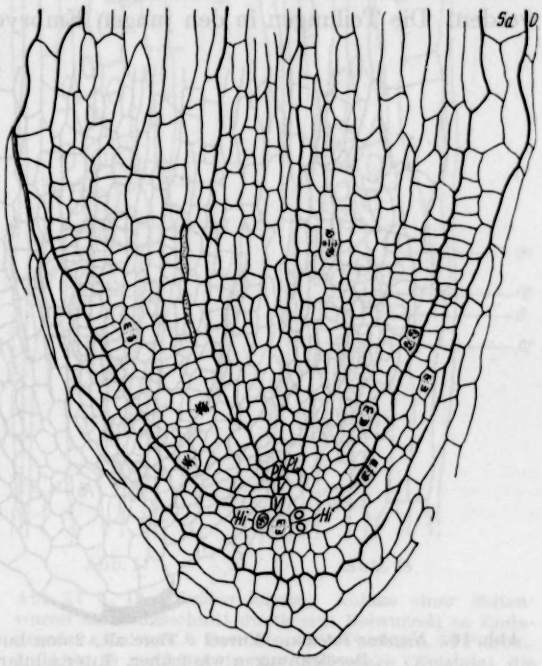


Abb. 15. *Nuphar luteum*. Medianer Längsschnitt durch eine 4 Tage alte 1,5 mm lange Radicula. Bezeichnungen wie früher. *Hi* seitliche Haubeninitialen. Der dermatogene Anteil der Haube löst sich rückwärts ab

Die Abb. 16 zeigt eine 2 mm lange Primärwurzel kurz vor dem Absterben. Sie war etwa 8 Tage gewachsen. Hier teilt sich die Zentralzelle in antikliner Richtung, ihre Abkömmlinge ergänzen damit das Periblem. Im Periblem und Plerom haben sich große Intercellularräume gebildet, die auch schon in jüngeren Entwicklungsstadien der Primärwurzel auftreten. Das Plerom ist in Abb. 15 und 16 am Ursprung kaum abgegrenzt.

In einigen seltenen Fällen konnte Polyembryonie beobachtet werden. Die Teilungen in den jungen Embryonen verlaufen anfänglich

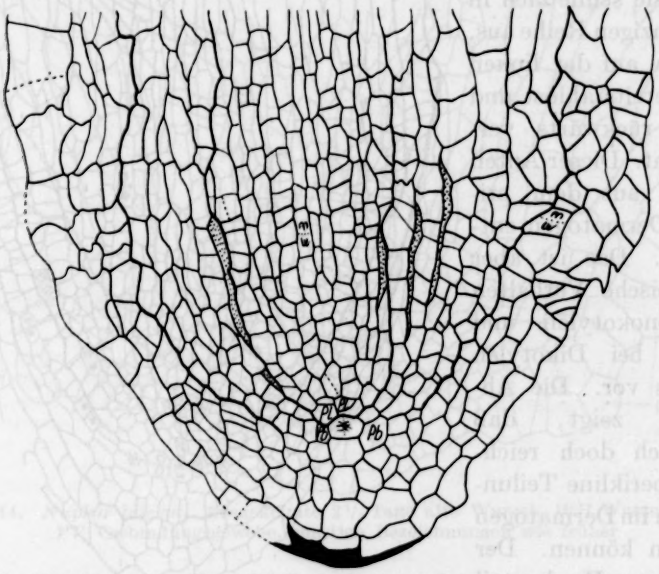


Abb. 16. *Nuphar luteum*. Wurzel 8 Tage alt, 2 mm lang, kurz vor dem Absterben. Bezeichnungen wie früher. Intercellularen punktiert

abweichend vom üblichen Teilungsmodus. Trotzdem konnten in einem reifen Samen drei Embryonen beobachtet werden, die völlig normal ausgebildet waren. Ihre Anordnung im Samen ließ erkennen, daß sie sich aus der Eizelle und den beiden Synergidenzellen entwickelt hatten.

b) Die Entwicklung der Seitenwurzeln. Da die Anlage der ersten Beiwurzeln bei Nuphar sehr schwer zu untersuchen waren, studierten wir Entstehung und Wachstum von Seitenwurzeln. VAN TIEGHEM und DOULIOT (1888) bezeichnen *Nuphar luteum* als einen Vertreter der Dikotyledonen, dessen Bei- und Seitenwurzeln sich nach dem monokotylen Typ entwickeln sollen. Während die „Epidermis" bei den Dikotyledonen im zweiten periklinen Teilungsschritt von der äußersten Zellreihe der Anlage in ihrer gesamten Ausdehnung abgespalten wird soll diese Aufspaltung bei den Monokotylen nur in ein bis zwei mittleren

Zellen stattfinden. Infolgedessen entstünde bei den Dikotylen eine Wurzelhaube, die sich in einer erhalten bleibenden „Epidermis" fortsetzt, bei den Monokotylen aber ein Kalytrogen, welches nur die Wurzelhaube bildet und rückwärts keine „Epidermis" erzeugt. Erst später gibt das Periblem durch tangentiale Teilungen eine „Epidermis" ab. Wir haben in einer früheren Arbeit (HEYDEL und v. GUTTENBERG 1957) aber für Liliaceen festgestellt, daß anfangs kein Unterschied zwischen Mono- und Dikotyledonen vorliegt, vielmehr erst im Laufe der weiteren Entwicklung bei den Monokotylen der basale ungeteilte Abschnitt des Kalyptrogens abstirbt. Dadurch wird einerseits die Haube frei, während andererseits nun die erste Periblemschicht zum sekundären Dermatogen wird. Die „Epidermis" von VAN TIEGHEM bezeichneten wir als primäres Dermatogen.

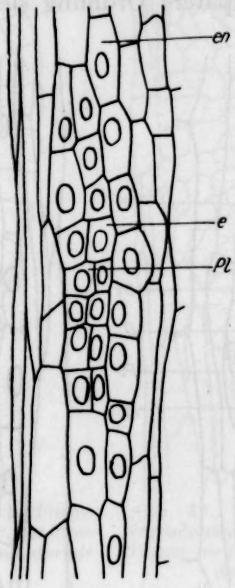


Abb. 17

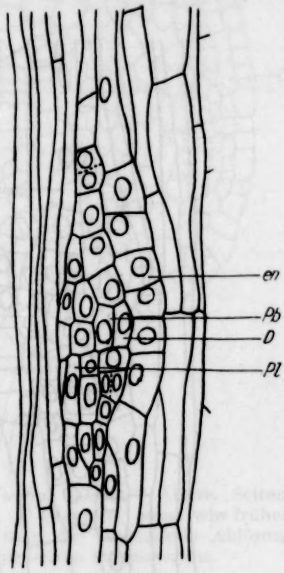


Abb. 18

Abb. 17 u. 18. *Nuphar luteum*. Anlage einer Seitenwurzel im Längsschnitt durch eine Beiwurzel; *en* Endodermis, *e* Epistele = Dermatogen + Periblem, *Pl* Plerom. In Abb. 18 erscheint in der Außenlage (Epistele) die erste perikline Wand, die die erste Zelle des Dermatogens *D* vom Periblem *Pb* trennt

Die Entwicklung der Seitenwurzeln beginnt wie üblich im Pericambium der Beiwurzeln, und zwar durch perikline Teilungen, wie dies Abb. 17 darstellt. Sie zeigt die Anlage einer jungen Seitenwurzel im Längsschnitt durch die Beiwurzel. Das Pericambium ist über einige Zellen zweischichtig geworden, darüber liegt eine einfache Zellschicht, die sich von den nach außen anschließenden Zellen durch ihren Plasmareichtum auszeichnet. Es handelt sich um die modifizierte innerste Rindenschicht, also um die Endodermis. Sie bildet hier indessen keine größere Wurzeltasche (poche), sondern bleibt einschichtig und geht im Verlauf der weiteren Entwicklung verloren.

In der Abb. 18 ist die Anlage durch perikline Teilung beider Anfangsreihen vierschichtig geworden. Die Abb. 19 läßt deutlich erkennen, daß die tangentiale Teilung der äußersten Zellreihe sich nicht auf wenige Zellen beschränkt, daß vielmehr die Wurzelanlage fast über ihre ganze

Breite dreischichtig wird. Abb. 20 zeigt eine Verdopplung des Pleroms, Periblem und Dermatogen sind noch schwach entwickelt. Des Plerommaterial ist stark vorgestoßen und nur in der Mitte gegen das Periblem abzugrenzen. Die Gesamtanordnung ist, wie auch sonst in diesem Stadium, eine fächerförmige (Abb. 21) (vgl. Heydel und v. Guttenberg 1957 über *Allium*). Erst in der Entwicklungsstufe der Abb. 22 beginnt allmählich die spätere Ordnung sichtbar zu werden. Unter

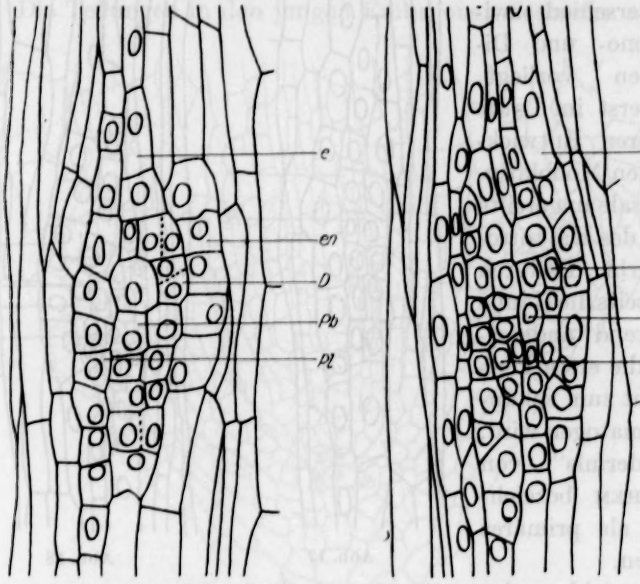


Abb. 19 Abb. 20

Abb. 19 u. 20. *Nuphar luteum*. Etwas ältere Seitenwurzelanlagen; über der Periblemschicht hat sich eine breite Dermatogenschicht gebildet (Abb. 19) und das Periblem vermehrt (Abb. 20)

einer breiten Haube finden wir ein in der Mitte drei Zellen hohes Periblem, anschließend das sich formierende Plerom.

Die Abb. 23 zeigt eine Seitenwurzel kurz vor dem Durchbruch. Die Wurzelhaube ist an der Spitze bereits achtschichtig. Sehr schön ist ihre Entstehung aus dem Dermatogen zu verfolgen. Das Periblem ist am Scheitel zweischichtig, aber von der Haube abgegrenzt. Das bei der Primärwurzel so auffällige Subdermatogen, das sich dort an der Haubenbildung beteiligt, ergänzt hier in normaler Weise das Periblem. Eine erwachsene Beiwurzel zeigt die Abb. 24. Im Periblem und Plerom erscheinen zahlreiche Intercellularräume. Der Pleromabschluß wird durch zwei Zellen gebildet, die auf einer zentralen Zellreihe stehen. Diese stellt den Periblemabschluß dar und besteht aus vier untereinander liegenden Zellen, deren genetische Zusammengehörigkeit gut zu

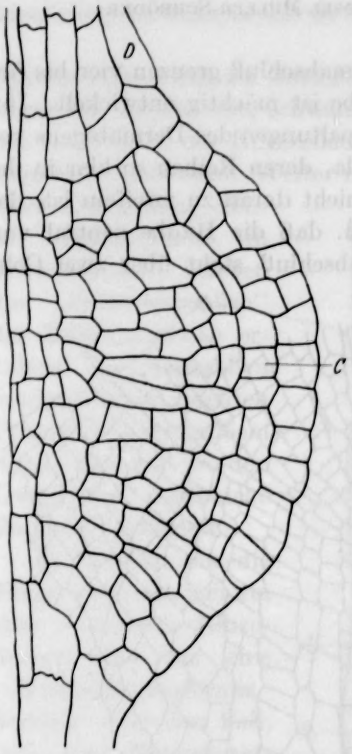


Abb. 21. *Nuphar luteum.* Fächerförmiges Stadium der Wurzelanlage. *D* Dermatogen, *C* Wurzelhaube. Endodermis fortgelassen

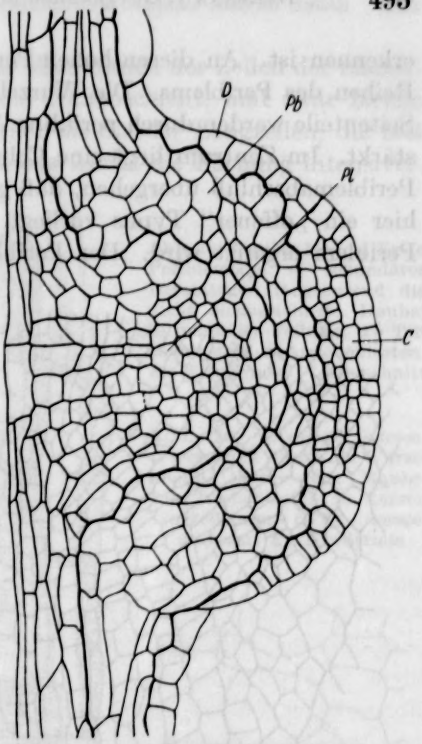


Abb. 22. *Nuphar luteum.* Ältere Seitenwurzelanlage. *C* Calyptra, sonst wie früher. Unten sieht man die beginnende Ablösung des primären Dermatogens

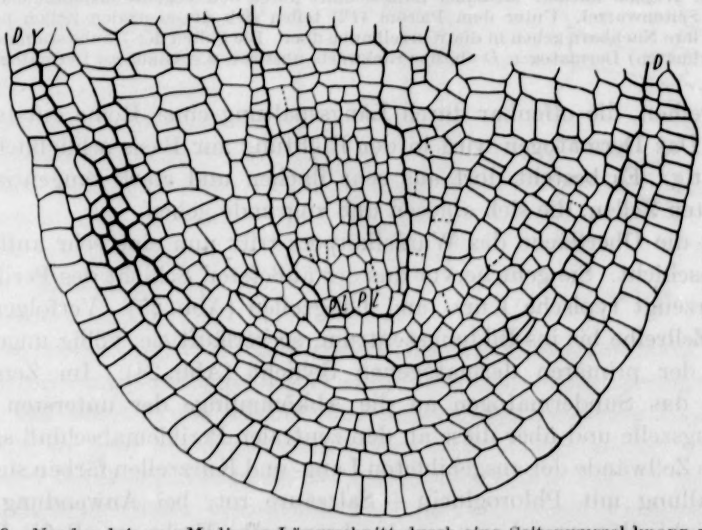


Abb. 23. *Nuphar luteum.* Medianer Längsschnitt durch eine Seitenwurzel knapp vor dem Austritt. *Pl* Plerom, *D* (primäres) Dermatogen, an der Spitze die Haube bildend, dazwischen das am Ursprung zweistöckige Periblem

erkennen ist. An diesen hohen Periblemabschluß grenzen vier bis fünf Reihen des Periblems. Die Wurzelhaube ist mächtig entwickelt. Ihre Seitenteile werden durch perikline Aufspaltungen des Dermatogens verstärkt. Im Zentrum liegt eine Columella, deren Reihen so klar in den Periblemabschluß übergehen, daß gar nicht daran zu zweifeln ist, daß hier ein „offener" Typus vorliegt, d. h. daß die Haube zentral vom Periblem ergänzt wird. Der Periblemabschluß steht über zwei Colu-

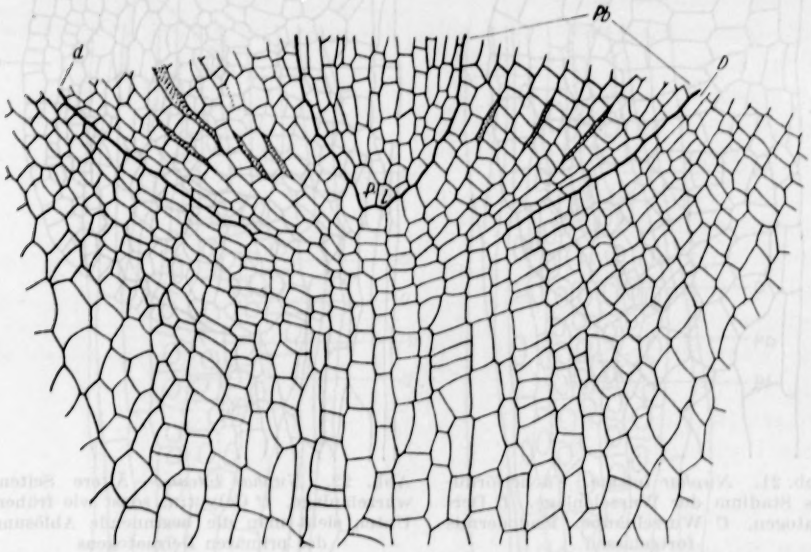


Abb. 24. *Nuphar luteum*. Medianer Längsschnitt durch den Vegetationspunkt der wachsenden Seitenwurzel. Unter dem Plerom (*Pl*) teilen sich die zentralen Zellen periklin. Sie und ihre Nachbarn gehen in die Wurzelhaube über. Die Seiten der Haube stammen vom (primären) Dermatogen *D* ab, das rückwärts abstirbt, *d* sekundäres Dermatogen

mellareihen, die offenbar durch Längsspaltung einer Reihe entstanden sind. Das Dermatogen wird in der Richtung zur Basis schließlich einschichtig. Es besteht dort aus sehr flachen und stark tangential gestreckten Zellen, die sich ablösen und zugrunde gehen.

An die Oberfläche des Wurzelkörpers tritt nun eine sehr auffällige Außenschicht. Sie geht hervor aus der äußersten Schicht des Periblems und erzeugt typische Kurz- und Langzellen (Abb. 25). Verfolgen wir diese Zellreihe bis ins Bildungszentrum, so verläuft sie, völlig ungeteilt, unter der primären dermatogenen Schicht (Abb. 24). Im Zentrum grenzt das Subdermatogen an die Abkömmlinge der untersten Verbindungszelle und über diese an den zentralen Periblemabschluß selbst.

Die Zellwände der ausgebildeten Lang- und Kurzzellen färben sich bei Behandlung mit Phloroglucin + Salzsäure rot, bei Anwendung von Chlorzinkjodlösung nehmen sie eine braungelbe Farbe an. Beide Reaktionen lassen auf Verholzung der Membranen schließen. Mit Sudan-

glycerin färben sich am stärksten die Membranen der Zellen der nächstfolgenden Schicht rot, schwächer die Außenschicht, und zwar färben sich die Wände der Kurzzellen stärker als die der Langzellen, die fast ungefärbt erschienen. Weiter rückwärts wurde die Färbung intensiver. Nach Behandlung dünner Querschnitte in Schwefelsäure blieben die „Suberinlamellen" der Zellmembranen erhalten. Die Kurzzellen besitzen einen dichten Protoplasten mit großem Kern, während in den Langzellen zahlreiche Vacuolen auftreten.

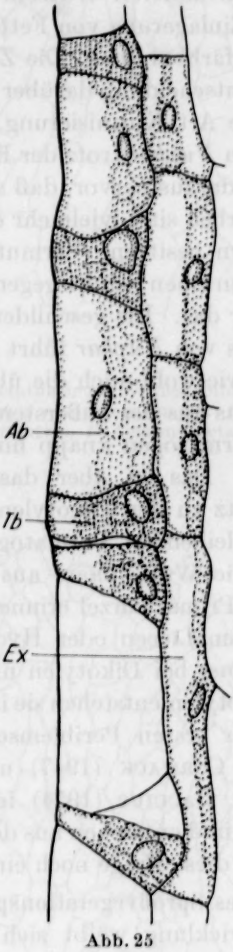


Abb. 25. *Nuphar luteum.* Erste Periblemlage = sekundäres Dermatogen (angrenzend die nicht eingezeichnete Haube) in inäqualer Teilung; *Tb* Trichoblasten, *Ab* Atrichoblasten, *Ex* Exodermis; Längsschnitt

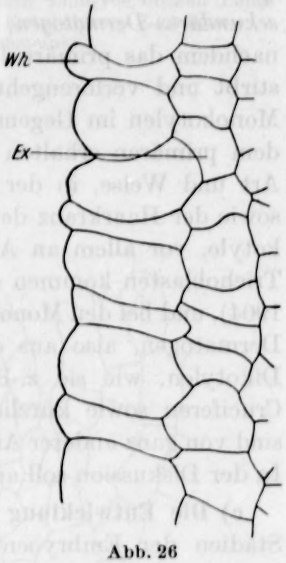


Abb. 26. *Nuphar luteum.* Querschnitt durch die Wurzel knapp hinter der Haube. Die Trichoblasten zu kurzen Wurzelhaaren (*Wh*) ausgewachsen; *Ex* Exodermis

Es besteht nun die Frage, ob es sich hier um eine veränderte Rhizodermis oder um eine Kurzzellenexodermis handelt. Für den Fall, daß eine Rhizodermis vorliegt, wären die sog. „Kurzzellen" Initialen von Wurzelhaaren, also Trichoblasten. Das Auftreten einer „Suberinlamelle" in den Kurzzellen spricht ganz klar dafür, daß hier Wurzelhaarinitialen vorliegen und wir somit eine Rhizodermis vor uns haben. Echte Kurzzellen von Exodermen sind in der Jugend niemals verkorkt, da hierdurch ihre Durchlässigkeit stark herabgesetzt oder sogar völlig gehindert würde. Für unsere Anschauung spricht auch, daß unter dieser Schicht eine einschichtige verkorkte Exodermis auftritt, sie geht aus der zweitäußersten Periblemlage hervor, die auch sonst bei Monokotylenwurzeln die exodermisliefernde Schicht ist. Eine Untersuchung älterer Wurzelteile hat überdies unsere Auffassung bestätigt. Die Kurzzellen wölben sich hier haarartig vor, sind also tatsächlich Trichoblasten (Abb. 26). Auch haben bereits Schwarz (1893) und

LEAVITT (1904) diese Trichoblasten als Wurzelhaarbildner erkannt. Die Angabe von FREIDENFELT (1904), daß *Nuphar* eine zweischichtige Exodermis besitzt, ist unrichtig. Später erfolgt in beiden Außenlagen eine tertiäre Verdickung. Die beobachtete Verholzung der Rhizodermis tritt auch bei zahlreichen anderen Wurzeln auf (vgl. v. GUTTENBERG 1940, S. 71), ebenso die Einlagerung von Fettstoffen, die resistent gegen Schwefelsäure und sudanfärbbar sind. Die Zartheit der Zellwände läßt in unserem Falle keine Entscheidung darüber zu, ob eine echte Suberinlamelle vorliegt oder eine Art Kutinisierung, was wahrscheinlicher ist. Daß die Trichoblasten von *Nuphar* trotz der Einlagerungen noch Wasser aufnehmen können, geht daraus hervor, daß sie weit hinter der Wurzelspitze noch nicht abgestorben sind, vielmehr einen dichten Protoplasten und einen großen Zellkern besitzen. Vermutlich stellen die „Suberinlamellen" der Trichoblasten einen Schutz gegen das Austreten von Stoffen in das umgebende Wasser dar. Die geschilderte Entwicklungsweise des Wurzelvegetationspunktes von *Nuphar* führt zu einer wichtigen Konsequenz. *Nuphar* besitzt (wie wohl auch die übrigen Nymphaeaceen) ein *sekundäres Dermatogen*, das aus der äußersten Periblemlage hervorgeht, nachdem das primäre Dermatogen knapp hinter der Wurzelspitze abstirbt und verlorengeht. Das ist aber das typische Verhalten von Monokotylen im Gegensatz zu den Dikotylen, wo die Rhizodermis aus dem primären erhalten bleibenden Dermatogen hervorgeht. Auch die Art und Weise, in der die Wurzelhaare aus Trichoblasten entstehen, sowie der Haarkranz der Primärwurzel erinnern sehr an manche Monokotyle, vor allem an Alismataceen oder Hydrocharitaceen. Derartige Trichoblasten kommen sonst bei Dikotylen nirgends vor (vgl. LEAVITT 1904), und bei den Monokotylen entstehen sie immer aus dem sekundären Dermatogen, also aus der ersten Periblemschicht. Trichoblasten bei Dikotylen, wie sie z. B. CORMACK (1947) und BÜNNING (1951) für Cruciferen sowie kürzlich HACCIUS (1954) für *Claytonia* beschrieben, sind von ganz anderer Art und entstehen aus dem primären Dermatogen. In der Diskussion soll auf diese Frage noch eingegangen werden.

c) Die Entwicklung des Sproßvegetationspunktes. Schon in frühen Stadien der Embryoentwicklung wölbt sich bei *Nuphar luteum* der Sproßvegetationspunkt deutlich vor. Im reifen Samen sind dann außer den Kotyledonen bereits zwei Blattanlagen entwickelt. Auf der Abb. 27 a ist ein junger Embryo im Längsschnitt wiedergegeben, Abb. 30 a zeigt die Umrisse eines Embryos im reifen Samen.

Der Vegetationspunkt geht aus dem Abschnitt 1 des Proembryos hervor. Schon frühzeitig bildet sich an seiner Oberfläche das Dermatogen als eine einreihige Zellschicht aus, die in der weiteren Entwicklung nur noch durch antikline Teilungen aufspaltet (Abb. 8, 9 usw.). Die Zellen unter der äußersten Schicht sind in diesen frühen Entwicklungs-

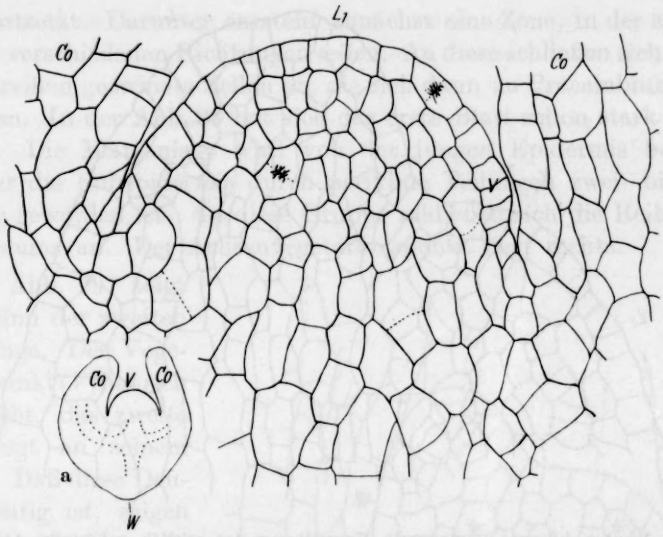


Abb. 27. *Nuphar luteum*. Vegetationspunkt eines unfertigen Embryos, dessen Längsschnitt im Umriß in Skizze a wiedergegeben ist. *Co* Kotyledonen, L_1 Anlage des Primärblattes, *V* Achsenvegetationspunkt

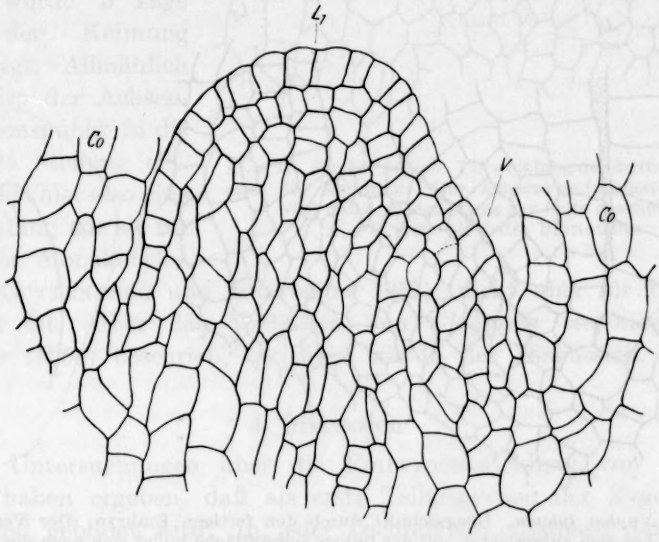


Abb. 28. *Nuphar luteum*. Allmähliche Differenzierung des Vegetationspunktes (etwas älter als in Abb. 27)

stadien unregelmäßig angeordnet. In der Abb. 11 haben sie sich in der Mitte periklin geteilt, wodurch der Vegetationspunkt vorgeschoben wird. Die Abb. 27 zeigt einen Embryo, bei dem sich die Kotyledonen bereits über dem Vegetationspunkt wölben. Dieser ist indessen nicht

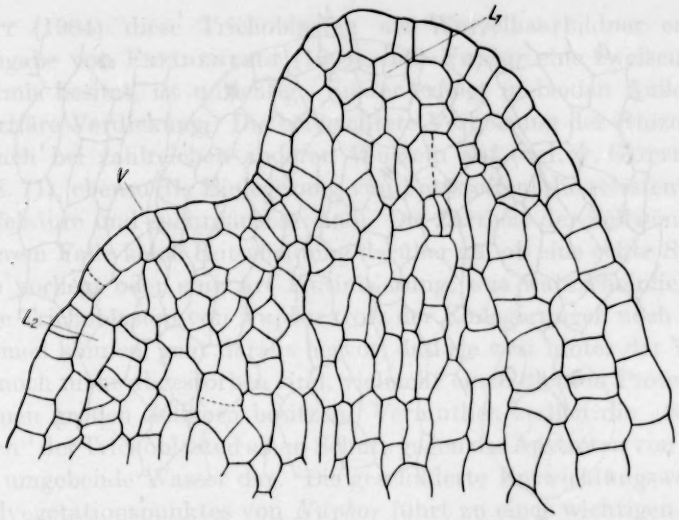


Abb. 29. *Nuphar luteum*. Beginnende Vorwölbung des seitlich gelegenen Achsenvegetationspunktes (*V*). Erste Andeutung der Bildung der zweiten Blattprimordie L_2, erste Blattprimordie L_1

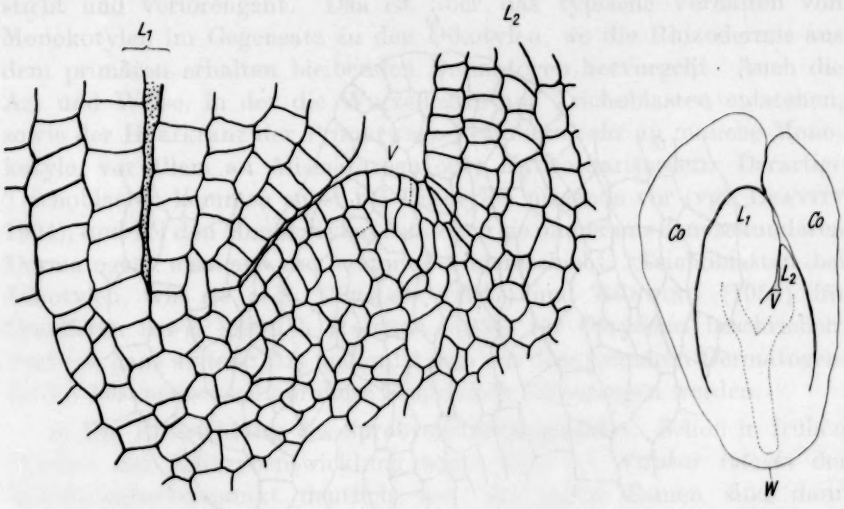


Abb. 30. *Nuphar luteum*. Längsschnitt durch den fertigen Embryo. Der Vegetationspunkt (*V*) hat sich aufgerichtet, auf der linken Schrägfläche bildet sich nach der Keimung das dritte Blatt. Rechts: Längsschnittumrißzeichnung des ganzen Embryos

der Vegetationspunkt der Achse, vielmehr die erste Blattprimordie. Der Achsenvegetationspunkt liegt am Grunde der rechten Seite des Höckers und ist durch reiche antikline Teilung des Dermatogens erkennbar. Der Höcker ist von einem Dermatogen überzogen, das sich in die Kotyle-

donen fortsetzt. Darunter entsteht zunächst eine Zone, in der sich die Zellen in verschiedenen Richtungen teilen. An diese schließen sich große, in Längsreihen geordnete Zellen an, die sich dann zu Procambiumzellen aufspalten. In der Abb. 28 hat sich das erste Blatt schon stark vorgeschoben. Die Blattanlage wird von der jungen Epidermis bedeckt, unter der die Subepidermis durch perikline Teilungen zwei- bis dreischichtig geworden ist. An diese Gruppe schließen sich die Reihen des Procambiums an. Der Achsenvegetationspunkt liegt rechts.

Die Abb. 29 zeigt den Beginn der zweiten Blattanlage. Der Vegetationspunkt (*V*) hat sich vorgewölbt, das zweite Blatt liegt an seinem Grunde. Daß diese Deutung richtig ist, zeigen Abb. 30 und 31. Die erste bezieht sich auf den reifen Embryo, die zweite wurde 5 Tage nach der Keimung angefertigt. Allmählich rückt also der Achsenvegetationspunkt in die terminale Stellung ein. Wir finden hier also eine Entwicklung wie sie für zahlreiche Monokotylen (vgl. v. GUTTENBERG und Mitarbeiter 1957), nicht aber für Dikotyle bekannt ist. Über das Verhalten von *Claytonia virginiana*, das HACCIUS (1954) beschrieb, berichten wir in der Diskussion.

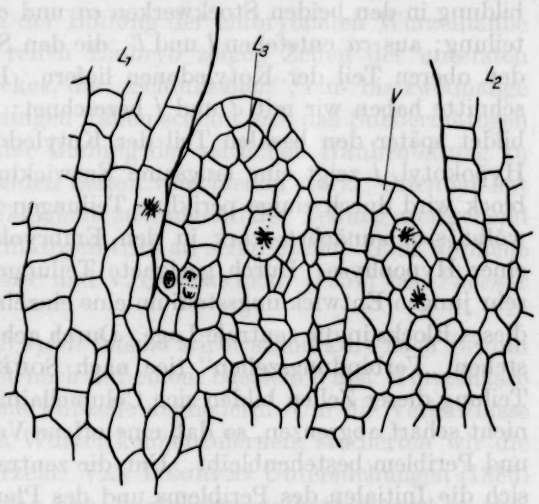


Abb. 31. *Nuphar luteum*. Entwicklung des dritten Blattes nach der Keimung. Der Achsenvegetationspunkt (*V*) wird dabei wieder etwas zur Seite geschoben. L_1—L_3 erste bis dritte Blattanlage

4. Diskussion

Die Untersuchungen über die Embryoentwicklung von *Nuphar luteum* haben ergeben, daß als erste Teilungswand der Zygote eine Querwand gebildet wird. In jeder Tochterzelle entstehen dann zwei senkrecht aufeinander stehende Längswände, wodurch der Embryo in das Oktantenstadium eintritt. Durch diese Wandbildung wird die Entstehung weiterer primärer Etagen unmöglich, es gibt nur *ca* und *cb*.

JOHANSEN rechnet auf Grund der älteren Arbeiten die Nymphaeaceen zum Astereentypus. In Wirklichkeit hat indessen *Nuphar* mit

diesem nur das eine gemeinsam, daß aus den beiden Ausgangszellen sich der ganze Embryo aufbaut. Es entstehen:

aus *ca* . . . . . pvt+pco z. T.
aus *cb* . . . . . pco z. T.+phy+icc+iec+co.

Hierbei bedeuten pco die Kotyledonarregion, pvt den Sproßvegetationspunkt, phy das Hypokotyl, icc die Initialen des Zentralzylinders, iec die Initialen des Periblems, co die Wurzelhaube.

Erst nachträglich kommt es durch korrespondierende Querwandbildung in den beiden Stockwerken *ca* und *cb* zu einer weiteren Unterteilung; aus *ca* entstehen *l* und *l'*, die den Sproßvegetationspunkt und den oberen Teil der Kotyledonen liefern. Die von cb gebildeten Abschnitte haben wir mit *d* und *f* bezeichnet; *d* wächst rasch heran und bildet später den basalen Teil der Kotyledonen und das rudimentäre Hypokotyl, *f* zeigt eine langsame Entwicklung. Ein erst kleiner Zellblock wird durch einige perikline Teilungen vier- bis fünfschichtig und wölbt sich zunächst stark in den Embryokörper vor. Er entspricht einer Hypophyse. Durch geeignete Teilungen gelangt schon in einem sehr jungen Entwicklungsstadium eine einzelne Zelle der oberen Schicht dieses Blocks in die zentrale Lage. Durch achsenparallele Teilungen entstehen „Verbindungszellen" (iec nach Souèges). Durch transversale Teilung dieser Zellen bilden sich Columellainitialen (ico), die sich aber nicht scharf abgrenzen, so daß eine offene Verbindung zwischen Haube und Periblem bestehenbleibt. Um die zentrale Verbindungszelle haben sich die Initialen des Periblems und des Pleroms in Form eines „Hufeisenbogens" angeordnet. Nach unten schließen sich an sie die hier glatt durchgehenden Haubenreihen.

Die junge wachsende Primärwurzel zeigt im Bildungszentrum zunächst keine Veränderung gegenüber den Verhältnissen der Wurzel im reifen Samen. Erst zwei bis drei Tage nach Keimbeginn finden in den Verbindungszellen Längsteilungen statt, durch die das primäre Periblem allseitig ergänzt wird. Diese Zellen beginnen sich nun auch achsenparallel zu strecken und quer zu teilen. Auf diese Weise wird zentral eine Art Columella gebildet, deren Reihen mit dem Periblem in offener Verbindung stehen. Seitlich biegen Zellreihen knieförmig aus der Haube in das Periblem ein. Hier finden sich auch die Initialen Hi, die die Flanken der Haube ergänzen. Die zentralen Zellen sind also nicht nur Lieferanten des Periblems (iec) nach Souèges, sie entsprechen vielmehr den „Initiales communes" von Treub (1876), weshalb wir für sie den Namen „Verbindungszellen" prägten. Ungewöhnlich ist die Bildung der Wurzelhaube. Der junge Embryo wird von einem einschichtigen Dermatogen bedeckt, in das sich am Wurzelpol die Zellen des untersten Hypophysenstockwerkes einfügen. An die mittleren Etagen des Hypo-

physenblockes schließen sich seitlich Zellen eines Subdermatogens, die sich schon früh in ihrer Färbbarkeit von den übrigen Zellen des Periblems unterscheiden. Ihr Teilungsmodus entspricht dem eines Wurzeldermatogens bei der Haubenbildung. Sie wird nämlich zum Hypophysenblock, also dem Zentralteil der Wurzelhaube hin, durch perikline Teilungen mehrschichtig. Das Subdermatogen wird eine Strecke hinter der Wurzelspitze einschichtig und verläuft unter der Epidermis in den Kotyledo. Dort beteiligt sie sich durch tangentiale Aufspaltung an der Bildung der inneren Gewebe.

Das Dermatogen ist an der Bildung der embryonalen Wurzelhaube kaum beteiligt. Erst im reifen Embryo zeigen Zellen der untersten Etage des Hypophysenblockes, die „Schlußzellen", ein- bis zweimalige tangentiale Spaltung. In einigen Fällen scheint sich das Subdermatogen nicht oder nur wenig an der Bildung der seitlichen Haubenteilung zu beteiligen oder auch auf beiden Seiten verschieden stark. Offenbar hat das Urdermatogen seine Fähigkeit zu tangentialer Teilung weitgehend eingebüßt, und das Subdermatogen tritt an seine Stelle. Ganz ähnliche Verhältnisse fanden Pankow und v. Guttenberg (1957) bei *Phoenix dactylifera*.

Die Primärwurzel von *Nuphar luteum* stirbt schon kurz nach Beginn der Keimung ab. Sie bildet noch auf einem basalen Wulst Wurzelhaare aus, die auffälligerweise eine Fußzelle abgliedern. Um die Verhältnisse in einer weiter wachsenden Wurzel kennenzulernen, studierten wir die Entwicklung der Seitenwurzeln. Van Tieghems Untersuchungen (1886) an Wurzelvegetationspunkten von Nymphaeaceen hatten ergeben, daß bei *Nuphar luteum*, *Nymphaea alba* und *Victoria regia* die Wurzelhaube ihre eigene Initialschicht besitzt, die Verhältnisse also wie bei den Monokotylen liegen. Die Behauptung van Tieghems, daß bei allen Monokotylen die zweite perikline Teilung nur über wenige mittlere Zellen ein Kalyptrogen abspaltet, hat sich schon bei Liliaceen als falsch erwiesen, wie Heydel und v. Guttenberg (1957) kürzlich für Seitenwurzeln von Liliaceen ausführlich beschrieben.

Die Seitenwurzel von *Nuphar* entsteht in normaler Weise aus dem Pericambium der Beiwurzel. Über ein fächerförmiges Stadium wird die endgültige Anordnung der Elemente erreicht. Dabei sieht man, daß das Dermatogen über eine breite Fläche zur Haube aufspaltet. Der basale Ansatz des Dermatogens trennt sich dann aber nach Art der Monokotylen ab. An älteren Wurzeln besteht eine offene Verbindung zwischen dem mehrstöckigen Periblem und der Haube, die hier ohne Beteiligung eines Subdermatogens zustande kommt. Die Angabe von Erikson (1876), daß die Nymphaeaceen ein „Transversalmeristem" besitzen, ist also richtig. Die Haube reicht nur über eine kurze Strecke rückwärts, wo sich dann ihre Zellen einschließlich des Kalyptrogens

vom Wurzelkörper ablösen, so daß dieser frei hervortritt. An den dickeren Beiwurzeln, die nur eine kappenförmige Haube besitzen, wird dies besonders deutlich. Es gibt also kein Dermokalyptrogen wie bei den Dikotylen, das sich in ein erhalten bleibendes primäres Dermatogen (Rhizodermis) fortsetzt, vielmehr tritt die äußerste Periblemschicht als sekundäres Dermatogen hervor, wie es für die Monokotylen zutrifft. An die Oberfläche des Wurzelkörpers tritt nun eine Zellschicht, in der durch inäquale Teilung zweierlei Zellen, kurze und lange, entstanden sind. Zum Bildungsmittelpunkt hin verläuft sie ungeteilt über der Wurzelhaube und findet schließlich Anschluß an den Periblemursprung. Die darunter gelegene Schicht hat sich in besonderer Weise differenziert. Ihre Zellen sind höher, aber schmaler als die sich innen anschließenden Elemente der Rinde und bilden eine Exodermis. In beiden Schichten läßt sich Verkorkung, in der äußeren auch Verholzung nachweisen. Die äußere Schicht, die nunmehr die Außenlage der ganzen Wurzel bildet, erinnert auf den ersten Blick an eine Kurzzellenexodermis. Sie ist es aber keinesfalls, denn im späteren Verlauf wölben sich die Kurzzellen schlauchartig vor, es handelt sich also um Trichoblasten. Kurzzellen von Exodermen sind in der Jugend stets unverkorkt, wogegen frühzeitige Verholzung und Anlage einer Suberinlamelle (oder auch Kutinisierung) von Wurzelhaaren auch sonst vorkommt. Daß die Kurzzellen von *Nuphar* auch später noch Wasser aufnehmen können, ergibt sich daraus, daß sie am Leben bleiben. Die hauchdünne Suberinlamelle dürfte den Austritt gelöster Substanzen hemmen. Daß es sich bei dieser Schicht um eine Rhizodermis handelt, geht auch daraus hervor, daß ihr eine einfache Exodermis folgt. *Nuphar* besitzt also zweierlei Wurzelhaare: solche, die aus dem primären Dermatogen hervorgehen und am Embryo einen Haarkranz an der Basis der reduzierten Primärwurzel bilden, und weitere, die aus dem sekundären Dermatogen späterer Wurzeln aus Trichoblasten hervorgehen. Dies kommt sonst nur bei einigen Monokotylen vor, so in auffälliger Weise bei Commelinaceen. Pinkerton (1936) fand, daß die Rhizodermis bei diesen ungewöhnlich lange erhalten bleibt. Nur die der Wurzelspitze genäherten Haare sind primär-rhizodermalen Ursprungs. Weiter rückwärts wölben sich „secondary root hairs" aus der folgenden Schicht vor und drängen die Zellen der absterbenden primären Rhizodermis samt deren Haaren auseinander. Die sekundären Haare sind braun, verdickt und kutinisiert und bedecken die Wurzel über eine lange Strecke. Pinkerton hielt die zweite Zellenlage für die Exodermis; sie trug indessen der Tatsache nicht Rechnung, daß bei Monokotylen diese zweite unter dem primären Dermatogen hervortretende Lage das sekundäre Dermatogen ist und sich eine Exodermis erst aus der dritten Lage (zweiten des Periblems) bilden kann. Eine Nachuntersuchung der ungenauen Angaben Pinkertons wäre nötig, wir zweifeln aber nicht daran, daß sie unsere

Auffassung, nach der hier ein sekundäres Dermatogen haarbildend ist, bestätigen würde. Soweit bei den Dikotylen Trichoblasten vorkommen, entstehen sie aus dem primären Dermatogen, und zwar in anderer Weise. Sie werden z. B. von CORMACK (1947) und BÜNNING (1951) für Cruciferen und kürzlich von HACCIUS (1954) für *Claytonia* beschrieben. Es liegen keine Kurz- und Langzellen vor, vielmehr bilden sich Trichoblasten über den Radialwänden der nachfolgenden Schicht aus, sie sind zunächst nur durch Plasmaspeicherung unterschieden. Die Regel des Auftretens von Trichoblasten über Radialwänden fanden wir indessen auch für unsere Kurzzellen bestätigt (Abb. 26).

Jedenfalls steht die Tatsache fest, daß sich die Nymphaeaceen in ihrer Hauben- und Rhizodermisbildung an die Mono- und nicht an die Dikotylen anschließen. Auch die Ausbildung des Wurzelhaarkranzes an der reduzierten Primärwurzel erinnert, wie schon bemerkt, an Monokotyle. Am überraschendsten ist das Verhalten des Vegetationspunktes von *Nelumbo*. Der Scheitel des Embryos, genau gegenüber dem Wurzelpol gelegen, sieht zunächst, umgeben von den beiden Kotyledonen, wie der eines Dikotylenkeimlings aus. Die weitere Entwicklung zeigt aber, daß hier eine Täuschung vorliegt. Der hochgewölbte Vegetationskegel ist nicht der Epikotylanlage einer Dikotylen homolog, sondern entwickelt sich zu einem Blatt, und der eigentliche Achsenvegetationspunkt wird nur durch eine kleine Zellgruppe am Grunde des Höckers repräsentiert, die sich zunächst kaum von der Umgebung unterscheidet. Allmählich wölbt sich diese Stelle schwach vor, und darunter erscheint ein neuer Bildungsherd, der später das zweite Blatt erzeugt. Während dessen Entwicklung richtet sich der Achsenvegetationspunkt nach und nach auf. Erst nach der Keimung, bei welcher weitere Blätter entstehen, erreicht er annähernd die apikale Lage. Aus der ersten Blattanlage entwickelt sich ein pfriemenförmiges Blatt mit kurzer basaler Scheide, das von den späteren Blättern völlig abweicht und völlig einem Monokotylenniederblatt entspricht. Eine derartige Entstehung der Plumula ist bisher nur für Monokotyle bekannt geworden. Schon ältere Autoren hatten sie hier beobachtet, TROLL (1950) dann für *Juncus bufonius* beschrieben, und wir (v. GUTTENBERG und Mitarbeiter 1957) haben einige Fälle genauer in ihrer Entwicklung studiert. Wir stehen also vor der überraschenden Tatsache, daß der Embryo von *Nuphar* und wohl der aller eigentlichen Nymphaeaceen sich im Bau seines Sproß- und seines Wurzelpols wie eine Monokotyle verhält. Auch die Bei- und Seitenwurzel entwickelt sich nach Art der Monokotylen, und sie besitzt wie viele solche Kurzzellen-Trichoblasten. Dazu kommen weitere schon bekannte Übereinstimmungen, vor allem im Gefäßbündelbau — es fehlt ein eigentliches Cambium und sekundärer Zuwachs — und im Verlauf der Bündel. Der Einwand STRASBURGERS, daß sich letzterer nur aus dem Wasserleben erkläre, scheint uns nicht stichhaltig. Im ganzen

müssen wir sagen, daß beim Embryo von *Nuphar* als einziges dikotyles Merkmal die Kotyledonen übrigbleiben, die die Samen nicht verlassen.

Wir haben die Anlage der Kotyledonen nur an Schnitten studiert. Sie ist ungewöhnlich, da sie nicht am oberen Ende des Hypokotyls erfolgt. Ein solches fehlt äußerlich, und die Basen der Kotyledonen umschließen eine niedere Plerom-Periblemanlage so, daß sie bis zum Wurzelpol reichen.

An älteren Embryonen von *Nuphar* (Abb. 32) sind die Kotyledonen nur am Grunde verwachsen und gänzlich stiellos; sie entspringen an der Stelle, an der sonst das Hypokotyl auftritt, also seitlich von diesem. Ähnliches beobachtete Lyon (1901) bei *Nelumbo*, denn er sagt, daß der Wurzelpol von kotyledonarem Gewebe eingeschlossen sei.

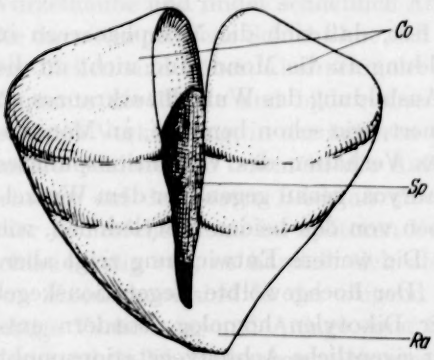


Abb. 32. *Nuphar luteum*. Freigelegter fertiger Embryo. *Co* „Kotyledonen", *Ra* Wurzelpol, *Sp* „Sproßvegetationspunkt". Nach der im Text gegebenen Deutung ist *Co* eine Hypokotylwucherung, *Sp* der Kotyledo

Nach den Untersuchungen von Lyon (1901) über *Nelumbo* und von Cook (1902, 1906, 1909) über *Nymphaea* und *Castalia* legt der Embryo erst einseitig einen ringförmigen Wulst an, aus dem erst später die beiden Kotyledonen entstehen, die am Grunde verwachsen bleiben. Dadurch kommt die Plumula, wie Strasburger (1902) ausführte, vorübergehend in eine seitliche Lage. Lyon sieht in der Tatsache, daß die Kotyledonen gemeinsam entstehen und sich erst später spalten, ein monokotylisches Merkmal. Diese Ansicht ist, wie schon Strasburger hervorhob, sicher falsch. Ein monokotyles Keimblatt kann nicht der Basis entspringen.

Der Befund von *Nuphar* legt es nahe, auf die Frage der Ableitung des Kotyledos der Monokotylen von denen der Dikotylen kurz einzugehen. Man hat dabei vor allem an zwei Möglichkeiten gedacht: Verwachsung der beiden Kotyledonen (unilaterale Synkotylie) und Verlust eines Kotyledos (Heterokotylie = extreme Anisokotylie). Während für die erste Annahme kein sicherer Beweis geliefert werden konnte (Haccius 1952b), ist die zweite gut fundiert. Man denke z. B. an die Arbeit von Metcalfe (1936) über *Ranunculus ficaria* und von Haccius (1954) über *Claytonia virginica*. Metcalfe irrte zwar so gut wie sicher, als er am Embryo unter der Grube des Vegetationspunktes den Rest eines zweiten Kotyledos erblicken wollte. Der Höcker ist sicher nichts anderes als der Scheidenteil des Kotyledos, wie es Haccius für ihr Objekt richtig beschrieb. Merkwürdigerweise weist sie aber in ihrer Arbeit

auf das monokotylenartige Verhalten der Sproßvegetationspunkte gar nicht hin. Er ist zwar in den Abbildungen mit V bezeichnet, wird aber nicht weiter beschrieben. Man sieht am ausgewachsenen Embryo (Abb. 5 III) am Grunde der Tasche große subdermatogene Zellen, unter welchen die Wände bogig verlaufen. Die Keimpflanze entwickelt erst ein Laubblatt, der Achsenvegetationspunkt liegt seitlich im Primordiengrunde eingesenkt und erhebt sich (Abb. 9 I) offenbar erst nach der Bildung des zweiten Blattes. Dieses Verhalten entspricht dem vieler Monokotylen und kommt bei Dikotylen meines Wissens sonst nicht vor. Wohl entwickelt *Nuphar* aus seinem Sproßvegetationspunkt auch erst ein Blatt, jedoch nicht aus seiner seitlichen Vorwölbung, sondern aus dem apikalen Scheitel.

Es sei gestattet, hier folgende ökologische Betrachtungen einzuschalten: Die Keimblätter der Dikotylen stellen für das junge Epikotyl einen ausgezeichneten Schutz im Verlaufe der Keimung dar. Ist nur ein Kotyledo vorhanden, so liegt der Vegetationspunkt einseitig frei, und das macht es verständlich, daß er (auch bei Dikotylen!) eingesenkt wird und daß erst Laubblätter entstehen, die nun den Schutz des Entwicklungszentrums übernehmen. Bei den Monokotylen läßt sich hier eine klare Reihe erkennen. Jene Formen, die vor der Keimung ihre Endospermstoffe an den Kotyledo abgeben, schützen den Vegetationspunkt durch die Kotyledonarscheide. Das gilt auch noch für die Fälle, wo der Kotyledo nur vorübergehend in seinem apikalen Teil zum Haustorium wird wie bei *Allium*. Wird der Kotyledo aber zum Haustorium, erfolgt also die Keimung hypogäisch, so kann entweder ein sog. Mittelstück entstehen, dessen Scheide sich zu einer Koleoptile verlängert, wie bei den Commelinaceen, oder es fehlt auch das Mittelstück (Gramineen). Das erfordert eine verlängerte Koleoptile, ja, es führt sogar zu einer Verwachsung mit dem Epikotyl, also zur Bildung des Mesokotyls. Wenn bei *Stratiotes* nach Baude (1956) sofort ein Epikotyl auftritt, so ist das bei einer Wasserpflanze verständlich, da hier keine feste Bodenschicht zu durchdringen ist. Das gilt auch für *Nelumbo*, die Kotyledonen verbleiben im Boden, und als Bohrorgan im Schlamm bildet sich das Primärblatt pfriemenförmig aus und umhüllt mit seiner Scheide gleich einem monokotylen Kotyledo den unentwickelten Vegetationspunkt. Daraus und aus dem Gesamtbau des Keimlings, besonders aber durch den Vergleich mit den Embryonen mancher monokotyler Wasserpflanzen ergibt sich zwanglos eine ganz neue Deutung. Die Embryonen von *Ruppia maritima* (Wille 1883, Murbeck 1902) und von *Zostera marina* (Rosenberg 1901) besitzen vom Wurzelpol ausgehende, becher- oder schalenförmige Körper (vgl. die Abb. 1502 bei Goebel III, S. 1411) aus derem Grunde der pfriemenförmige Kotyledo samt Vegetationspunkt hervortritt. In ganz gleicher Weise entstehen bei *Nuphar* die

fleischigen Lappen schon am Wurzelpol und umschließen ein zunächst spindel- später pfriemenförmiges Organ. Bei *Nymphaea advena* wird die Übereinstimmung noch größer, da hier der „Kotyledo" eine ungespaltene Schale darstellt. *Nuphar* scheint unter allen Nymphaeaceen die tiefste Spaltung zu besitzen, kann also nicht als typisch gelten. Die beschriebenen Gebilde von *Ruppia* und *Zostera* sind trotz ihrer Gestaltsänderung zweifellos Hypokotylwucherungen, und das gleiche kann mit gleichem Recht für die Nymphaeaceen angenommen werden, mit dem unwesentlichen Unterschied, daß der ursprünglich einheitliche Wulst sich später in zwei Lappen spaltet. Die Konsequenz ist, daß das, was wir bisher als Sproßvegetationskegel bezeichneten, tatsächlich, wie oben angenommen, der Kotyledo ist; damit stimmt überein, daß er sich wie viele monokotyle Keimblätter zu einem pfriemenförmigen Niederblatt mit seitlich eingesenktem Vegetationspunkt entwickelt. Die beiden Lappen der Nymphaeaceen können, um dies nochmals zu betonen, keine Kotyledonen sein, da sie *seitlich* der inneren Hypokotylanlage entstehen und nicht an deren oberem Ende.

Dadurch wären die Nymphaeaceen eindeutig zu den Monokotylen zu stellen. Alle genannten Hypokotylwucherungen stellen Speicherorgane dar, die sich im Zusammenhang mit der submersen Keimung entwickeln. Überdies bewirken sie nach Verlust der Samenschale eine Verankerung des Keimlings.

Zusammenfassung

1. Die Zygote von *Nuphar luteum* bildet durch eine Querwand die Etagen *ca* und *cb*, die den ganzen Embryokörper aufbauen (vgl. Abb. 1). Dabei entstehen sekundär aus *ca* die Abschnitte *l* und *l'*, aus *cb* zwei mit *d* und *f* bezeichnete Teile (Abb. 3). Ein Suspensor fehlt.

2. Aus *l* und *l'* gehen der „Sproßvegetationspunkt", aus *l'* auch die oberen Teile der „Kotyledonen" hervor; *d* bildet Plerom und Periblem einer Hypokotylanlage, die sich nicht weiter verlängert, vielmehr seitlich die Basen der Kotyledonen erzeugt. Aus *f* entsteht ein Hypophysenblock, der zu oberst zentrale Verbindungszellen (= iec), anschließend eine Columellaanlage (= ico) liefert (Abb. 7, 12). Die Seitenteile des Blockes grenzen, da sich dieses in den Embryokörper vorwölbt, an dessen Periblem und Dermatogen.

3. Die Wurzelhaube bildet sich in ungewöhnlicher Weise aus dem Hypophysenblock und seitlich anschließenden Elementen des Periblems und Dermatogens. Jenes erzeugt durch tangentiale Aufspaltung der Außenlage (des Subdermatogens) zur Spitze hin meist einen größeren Anteil der Haube als dieses. Das Subdermatogen geht in die „Kotyledonen" über und erzeugt dort einen Teil der Gewebe.

4. Die Primärwurzel zeigt nach der Keimung kein nennenswertes Wachstum und bildet an der Basis einen Haarkranz. Die Wurzelhaare gliedern eine basale Zelle ab. Im Bildungszentrum bleiben Periblem und Haube verbunden.

5. In Seitenwurzeln entsteht die Haube nur aus dem aufspaltenden Dermatogen. Dieses hebt sich nach Art der Monokotylen an der Basis ab. Die austretende Wurzel besitzt also nur eine Haubenkappe, und darunter bildet sich aus der äußersten Periblemlage ein sekundäres Dermatogen. Dieses gilt auch für Beiwurzeln.

6. Das sekundäre Dermatogen erzeugt durch inäquale Teilung Trichoblasten.

7. Der „Sproßvegetationspunkt" täuscht einen epikotylen Vegetationskegel vor. In Wirklichkeit erzeugt er ein pfriemenförmiges Blatt mit basaler Scheide, an deren Grunde der Achsenhöcker und das erste normale Laubblatt entstehen. Der Achsenkegel rückt erst allmählich in die apikale Lage vor.

8. Der Embryo und die Keimpflanze entwickeln sich also am Wurzel- und Sproßpol nach Art einer Monokotyle. Die wachsende Wurzel besitzt die für Monokotyle charakteristischen aus dem sekundären Dermatogen entstandenen Kurzzellen-Trichoblasten. Dazu kommt die schon lange bekannte Polystelie geschlossener Gefäßbündel. Somit bliebe als einziges dikotyles Merkmal der Besitz zweier „Kotyledonen".

9. Die Kotyledonen führen ihren Namen zu Unrecht. Sie entstehen als seitliche Auswüchse der Hypokotylregion und nicht am Ende des Hypokotyls. Sie stellen also das Hypokotyl dar, ähnlich wie die Auswüchse von *Ruppia* und *Zostera*.

10. Das erste Blattorgan des scheinbaren „Sproßvegetationspunktes" ist ein Kotyledo, der nach Art der Monokotylen den Vegetationspunkt seitlich in einer Scheidengrube entwickelt.

11. Aus den angeführten Tatsachen, verbunden mit den unter 9. und 10. ausgeführten Deutungen, ergibt sich, daß die Nymphaeaceen zu den Monokotylen gehören. Zum mindesten stehen sie diesen so nahe, daß es vorteilhafter ist, sie ihnen anzuschließen als den Dikotyledonen. Jedenfalls stellen sie das auffälligste Bindeglied zwischen diesen beiden Klassen dar.

Literatur

Baude, E.: Die Embryoentwicklung von Stratiotes aloides L. Planta (Berl.) **46**, 649—671 (1956). — Bünning, E.: Über die Differenzierungsvorgänge in der Cruciferenwurzel. Planta (Berl.) **39**, 126—153 (1951). — Conard, H. S.: Note on the embryo of Nymphaea. Bot. Gaz. **33**, 389—390 (1902). — Science, N.S. **15**, 316. — The Waterlilies. Carnegie Inst. Publ. **4** (1905). — Cook, M. Th.: Development of the embryo sac and embryo of Castalia odorata and Nymphaea advena. Bull. Torrey bot. Club **29**, 211—220 (1902). — The embryogenesis of some Cuban Nymphaeaceae. Bot. Gaz. **42**, 376—392 (1906). — Notes on the embryology of the

Nymphaeaceae. Bot. Gaz. **48**, 56—60 (1909). — Cormack, R. G. H.: A comparative study of developing epidermal cells in White Mustard and Tomato roots. Amer. J. Bot. **34**, 310—314 (1947). — Erikson, J.: Über den Vegetationspunkt der Dikotylenwurzeln. Bot. Ztg **34**, 641—644 (1876). — Freidenfelt, T.: Der anatomische Bau der Wurzeln in seinem Zusammenhang mit dem Wassergehalt des Bodens. Bibl. bot. **12**, H. 62 (1904). — Guttenberg, H. v.: Der primäre Bau der Angiospermenwurzeln. In Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. 8, Abt. II, Teil 3. Berlin 1940. — Guttenberg, H. v., und Mitarbeiter: Embryologische und histogenetische Studien an Monokotyledonen. Bot. Studien **1957**, H. 7. — Haccius, B.: Die Embryoentwicklung bei Ottelia alismoides und das Problem des terminalen Monokotylen-Keimblattes. Planta (Berl.) **40**, 443—460 (1952a). — Verbreitung und Ausbildung der Einkeimblättrigkeit bei den Umbelliferen. Öst. bot. Z. **99**, 483—505 (1952b). — Embryologische und histogenetische Studien an „monokotylen" Embryonen. I. Claytonia virginica L. Öst. bot. Z. **101**, 285—303 (1954). — Heydel, H. R., u. H. v. Guttenberg: Vergleichende Studien über die Entwicklung von Primär-, Seiten- und sproßbürtigen Wurzeln von Liliaceen. Bot. Studien **1957**, H. 7, 40—90. — Hofmeister, W.: Neuere Beobachtungen über die Embryobildung der Phanerogamen. Jb. wiss. Bot. **1**, 82—189 (1858). — Holle, H. G.: Über den Vegetationspunkt der Angiospermenwurzel, insbesondere die Haubenbildung. Bot. Ztg **34**, 240—316 (1876). — Johansen, D. A.: Plant Embryology, Waltham, Mass. 1950. — Kroll, G. H.: Kritische Studien über die Verwertbarkeit der Wurzelhaubentypen für die Entwicklungsgeschichte. Beih. bot. Zbl. **28**, 134—158 (1912). — Leavitt, R. G.: Trichomes of the root in vascular Cryptogams and Angiosperms. Proc. Boston Soc. of Nat. Hist. **1904**. — Lewis, C. E.: Studies of some anomalous dicotyledonous plants. Bot. Gaz. **37**, 127—138 (1904). — Lyon, H. L.: Preliminary note of the embryogeny of Nelumbo. Science, N.S. **13**, 470 (1901a). — Observations on the embryogeny of Nelumbo. Minn. bot. Stud. **2**, 643—655 (1901b). — Metcalfe, C. R.: Interpretation of the Morphology of the single Cotyledon of Ranunculus Ficaria etc. Ann. of Bot. **56**, 103—120 (1936). — Murbeck, S.: Über die Embryologie von Ruppia rostellata. Kgl. Sv. Vetenskapsakad. Hdl. **36**, Nr 5 (1902). — Nicolai, D.: Das Wachstum der Wurzel. Schr. physik.-ökonom. Ges. Königsberg **7** (1865). — Pankow, H., u. H. v. Guttenberg: Studien über die Entwicklung monokotyler Embryonen und Keimpflanzen. Bot. Studien **1957**, H. 7, 1—39. — Pinkerton, M. E.: Secondary root hairs. Bot. Gaz. **98**, 147—158 (1936). — Rabbas, P.: Beiträge zur Kenntnis des Wachstums der Ranunculaceenwurzel. Diss. Berlin 1913. — Rosenberg, O.: Die Embryologie von Zostera marina. Kgl. Sv. Vetenskapsakad. Hdl. **27**, Nr 6 (1901). Afd. III. — Strasburger, E.: Ein Beitrag zur Kenntnis von Ceratophyllum submersum. Jb. wiss. Bot. **37**, 477—526 (1902). — Tieghem, M. Ph. van: Sur la croissance terminale de la racine dans les Nymphéacées. Bull. Soc. bot. France **33**, 264 (1886). — Tieghem, M. Ph. van, et H. Douliot: Rech. comp. sur. l'origine de membres endogènes dans les plantes vasculaires. Ann. Sci. nat., Bot., Ser. VII 8, 1—660 (1888). — Treub, M.: Le meristème primitif de la racine des Monocotyledones. Leiden 1876. — Troll, W.: Zur Klärung der Polaritätsverhältnisse des Pteridophytenembryos. Akad. Wiss. Mainz, Abh. math.-nat. Kl. **1950**. Lit.-Nr 10. Wille, N.: Om Kimens Udiklingshistorie hos Ruppia rostellata og Zanichellia palustris. Vedensk. Meddel. Naturhist. For. Kjøbenhavn **1—4** (1882—1886). — York, H. H.: The embryosac and embryo of Nelumbo. Ohio. Nature (Lond.) **4**, 167—176 (1904).

Prof. Dr. H. v. Guttenberg,
Botanisches Institut der Universität Rostock, Doberaner Str. 143

Planta, Bd. 51, S. 511—517 (1958)

Aus dem Institut für angewandte Botanik der Universität Tübingen

WIE DER GENERATIONSWECHSEL DER ARCHEGONIATEN UND DER PHANEROGAMEN ENTSTANDEN IST

Von

WALTER ZIMMERMANN

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Dezember 1957)

In seiner außerordentlichen Vielseitigkeit hat OTTO RENNER mit seiner Untersuchung „Zur Terminologie des Generationswechsels" 1916 zum Verständnis des Generationswechsels Entscheidendes beigetragen. Es sei darum versucht, als Festtagsgruß hier einen kurzen Überblick über unser heutiges Wissen von der Entstehung des Generationswechsels bei den Landpflanzen zu geben. Für Einzelheiten und auch für die Begründung darf ich auf frühere Arbeiten (insbesondere ZIMMERMANN 1953, S. 397—432 und 1955) verweisen.

A. Entstehung des Archegoniaten-Generationswechsels

Erfreulicherweise haben sich heute die sachlichen Vorstellungen über die Entstehung des Generationswechsels weitgehend genähert. Die sog. „Interkalationstheorie", nach der der Sporophyt zwischen zwei ursprünglich allein vorhandene Gametophyt-Generationen eingeschaltet worden ist, wird heute von phylogenetisch orientierten Wissenschaftlern kaum mehr vertreten und fristet höchstens noch in Lehrbüchern oder bei Nichtphylogenetikern ihr Dasein. In phylogenetischen Untersuchungen ist heute die in Abb. 1 dargestellte „*Transformationstheorie*" im Prinzip wohl allgemein anerkannt; d. h. als Ausgangsform für den Generationswechsel der Bryophyten und der Pteridophyten wird allgemein der in Abb. 1 B dargestellte isomorphe Generationswechsel angenommen: Zwei gleichgestaltete Generationen (ein haploider Gametophyt und ein diploider Sporophyt) wechseln regelmäßig miteinander ab.

Bei den Bryophyten hat sich dieser Generationswechsel dadurch geändert, daß nur der Gametophyt ein selbständiges Lebewesen blieb. Der Sporophyt wurde vom Gametophyten parasitär abhängig und meist zu einem Sporangium reduziert. Umgekehrt wurde bei den Pteridophyten der Sporophyt zur „Hauptgeneration", und der Gametophyt wurde zum kleinen „Prothallium" reduziert.

Auch heute sind jedoch trotz der durch RENNERS Arbeiten eingeleiteten terminologischen Untersuchungen noch terminologische Schwierigkeiten geblieben. Da ist z. B. die Frage noch ungeklärt, wie man eine

solche Ausgangsform mit isomorphem Generationswechsel nennen soll. Leider kann man den Generationswechsel an den fossilen Formen meist nicht unmittelbar erfassen. Es sind auch die betreffenden Fortpflanzungsorgane nur sehr selten erkennbar. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, daß man ja in der Phylogenie nicht nur mit einer Ahnenform, sondern mit einer ganzen Ahnenreihe rechnen muß.

Wir können bei unseren Problemen beispielsweise zwei Archegoniaten-Ahnen ins Auge fassen, etwa einen relativ späten Ahnen, bei

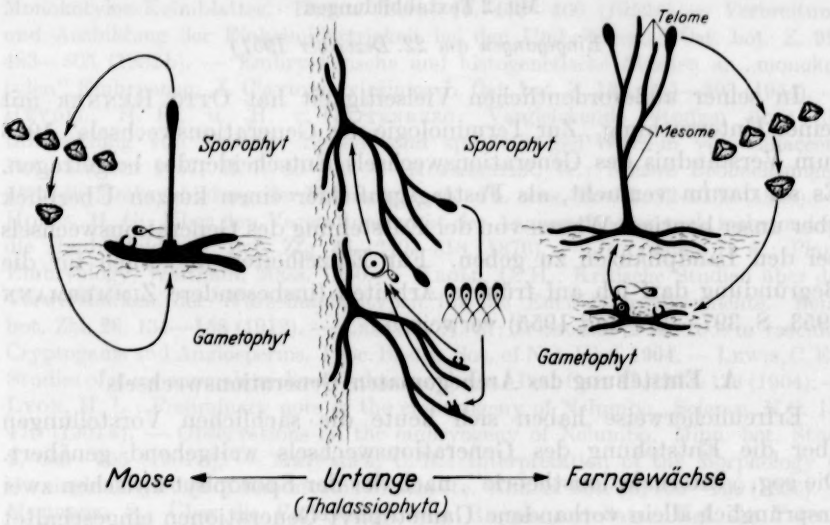


Abb. 1. Phylogenetische Herausbildung des Archegoniaten-Generationswechsels
In der Mitte als Ausgangsform ein Typ mit isomorphem Generationswechsel und noch freien Keimzellen in beiden Generationen.
Links der Bryophyten-Typ und rechts der Pteridophyten-Typ des Generationswechsels. Nach ZIMMERMANN 1955, S. 300.

dem die Eizelle schon im Gametangium (Archegonium) seßhaft geworden ist (so ZIMMERMANN 1930, S. 86); wir können aber auch — um etwa den Zusammenhang mit Thallophyten deutlicher zu machen — einen früheren Ahnen verwenden, bei dem die Eizelle sich noch außerhalb des Gametophyten entwickelt hat (ZIMMERMANN 1955, S. 300, sowie obige Abb. 1). Nun aber wieder zu den Sachproblemen.

Die Archegoniaten stammen zweifellos von Wasserorganismen ab. Vor ihrem Auftreten beschränkte sich das Leben auf das Meer. Auch ist noch heute — wie sich mehr und mehr herausgestellt hat — der isomorphe Generationswechsel bei den marinen Algen in sehr verschiedenen Gruppen weit verbreitet. Aus diesen Gründen hat der Verf. auch keinerlei Bedenken getragen, solche Ausgangsformen für den Generationswechsel der Archegoniaten als isomorph anzusprechen und sie „Algen" zu nennen. Diese Bezeichnung war um so näherliegend, als sich ja

— schon nach den Fossilfunden — der kormöse Wuchs der Archegoniaten erst im Laufe der Entwicklung auf dem Festlande aus einem „thallösen" Wuchs herausgebildet hat („Telomtheorie").

Das heißt, wir können für die Vorfahren der Archegoniaten folgende Merkmale festhalten:

1. Wasserpflanzen,
2. thallöser Wuchs,
3. isomorpher Generationswechsel,
4. grüne Chromatophoren.

Christensen 1957 hat nun — obwohl er sachlich zu denselben Ansichten gekommen ist — seine Meinung dahin formuliert, daß diese Ausgangsform nicht als Alge, sondern als Pteridophyt bezeichnet werden müsse. Das heißt, er hat seine Ansicht so formuliert: Die Bryophyten stammten von Pteridophyten mit isomorphem Generationswechsel ab. Sein Hauptargument war die (auch nach Ansicht des Verf. nicht zu widerlegende und z. B. bei Zimmermann 1930, S. 86 dargestellte) Annahme, die Eizelle dieser Ausgangsformen sei schon auf dem Gametophyten in einem Archegonium seßhaft gewesen.

Meines Erachtens liegt die Meinungsdifferenz hier vorzugsweise auf nomenklatorischem Gebiet: Kann man einen Organismus mit isomorphem Generationswechsel, der thallös ist, aber bei dem die Eizelle schon auf dem Gametophyten befruchtet wird, noch eine Alge nennen, oder muß man ihn schon als Pteridophyten bezeichnen? Wie ich früher ausgeführt habe, scheint mir für solche thallösen Organismen, bei denen wohl keine Anhaltspunkte für Landpflanzencharaktere vorliegen, die Bezeichnung „Alge" besser als „Pteridophyt". Auch bei eindeutig als Algen zu bezeichnenden Gewächsen (beispielsweise *Coleochaete*, *Rhodophyta* u. a.) ist die Eizelle ebenfalls seßhaft, und niemand denkt aus diesem Grund daran, die Bezeichnung Alge abzuweisen. Umgekehrt dürfte für den oben skizzierten thallösen Organismus die Bezeichnung „Pteridophyt" Schwierigkeiten bereiten.

Sachlich wird man den Einwänden Christensens entnehmen können, daß in der für die Archegoniaten gemeinsamen Ahnenreihe, auf einem späteren Stadium als der in Abb. 1 Mitte dargestellten Form, die Eizelle auf dem Gametophyten seßhaft geworden ist. Wie die Lebensverhältnisse dieses Typs waren (an den wohl Christensen in erster Linie denkt, wenn er von den Archegoniaten-Ahnen spricht), ist wohl schwer zu entscheiden. Es spricht manches dafür, daß der Ahn noch ein Meeresorganismus war (weil die Moose als Landpflanzen so spät nachweisbar sind); möglicherweise war jedoch das Archegonium schon eine „Anpassung", mindestens an vorübergehende Austrocknung wie bei Gezeitentangen. Aber sicher war dieser späte (den Bryophyten und Pteridophyten gemeinsame Ahn) noch thallös; sonst wäre der thallöse Charakter der ältesten Archegoniaten kaum zu verstehen.

Im Grunde liegt bei diesen Bezeichnungsfragen auch das in phylogenetischen Betrachtungen immer wiederkehrende Problem vor, wie weit man eine Ahnenform in die nach heutigen Organismen aufgestellten Begriffe einbeziehen kann. Dieses Abgrenzungsproblem spielt nicht nur bei den unmittelbaren Ahnen der beiden Archegoniaten eine Rolle, sondern auch bei späteren Gruppen, etwa bei der Frage, ob man die *Psilophyta* zu den Pteridophyten rechnen darf. Mit demselben Recht, mit dem CHRISTENSEN es beansprucht, den gemeinsamen Ahnen von Pteridophyten und Bryophyten einen Pteridophyten zu nennen, könnte man ihn ja auch einen Bryophyten nennen. Wenn man aber die Sonderstellung der gemeinsamen Vorfahren von Bryophyten und Pteridophyten gegenüber anderen thallösen, autotrophen Organismen herausheben will, könnte man auch den von CHURCH geprägten Ausdruck „*Thalassiophyta*" wählen.

Vor allem scheint es mir aber auch hier, wie RENNER in seiner eingangs formulierten Schrift schon unterstrichen hat, sehr wichtig, daß man die sachlichen und die terminologischen Fragen auseinanderhält.

B. Entstehung des Phanerogamen-Generationswechsels.

Der Grundgedanke W. HOFMEISTERS, daß bei den Phanerogamen der Gametophyt im Zusammenhang mit der Samenbildung weiter reduziert worden ist als bei den Pteridophyten, ist im Prinzip heute noch allgemein anerkannt. Ja, wir sind in der Lage, diesen Entwicklungsgang auch im phylogenetischen Sinne[1] zu beweisen (ZIMMERMANN z. B. 1932 und 1958). Der Nucellus der Samenanlage ist ein metamorphosiertes Makrosporangium, die Integumente sind Kragensyntelome, so daß die ganze Samenanlage einen synangialen Charakter hat. Schon unter den ältesten Sporangienständen der *Rhyniaceae* waren solche Synangien nicht selten. Bei den Pteridospermen sind im männlichen Geschlecht die Synangien ebenso häufig wie heute noch bei den Angiospermen.

Trotz dieser prinzipiellen Übereinstimmung über den phylogenetischen Weg erscheint allerdings das Bild unseres Wissensstandes infolge von Verflechtungen nomenklatorischer, taxonomischer und phylogenetischer Probleme verwirrt. Rein nomenklatorischer Art sind wohl die Überlegungen, ob man beispielsweise traditionelle Bezeichnungen wie Makrospore gegen Megaspore austauschen soll, ob man diese Bezeichnungen überhaupt beibehalten darf, wenn die weiblichen Sporen relativ klein sind, oder ob man auch dann von „Samen" sprechen darf, wenn (wie bei *Ginkgo* und bei *Cycadeen*) in diesen Fortpflanzungsorganen sich noch kein Embryo entwickelt hat (Praephanerogamen EMBERGERS). Diese nomenklatorisch-technischen Probleme werden wohl am besten in

[1] HOFMEISTER selbst hatte ja seinen „Vergleich" nicht streng im phylogenetischen Sinne verstanden.

möglichst traditioneller Weise gelöst, da auch eine Begriffsumfangänderung zur Klärung der sachlichen Probleme nicht beiträgt.

Ein phylogenetisches und zugleich auch taxonomisches Problem wird jedoch damit aufgeworfen, daß man fragt, ob im Bereich der, hergebrachterweise *Gymnospermae* genannten, Formen die Samenbildung nur einmal eingetreten ist oder (auch abgesehen von den *Lepidocarpales*) mehrmals. Es ist kaum ein Zweifel, daß wir bei diesen „Gymnospermen" zwei große Gruppen haben, die man etwa taxonomisch als Unterabteilungen bezeichnen kann: die in sich relativ geschlossenen *Coniferophytina (Voltziopsida, Ginkgopsida* und *Coniferae)* und die *Cycadophytina (Pteridospermae, Cycadopsida, Chlamydospermae* — mindestens p.p. — und *Angiospermae)*. Diese beiden Unterabteilungen stehen relativ weit auseinander. Es wäre darum denkbar, daß sie keinen gemeinsamen samentragenden Ahnen hatten, sondern auf irgendeine sporentragende Form zurückgehen. Damit wäre dann das Stadium der Samenbildung eine konvergent entstandene Organisationsstufe. Leider scheint es mir jedoch unmöglich, heute diese Frage mit Sicherheit zu entscheiden. Aus diesem Grund halte ich es technisch für das Zweckmäßigste, wenn unter deutlicher Anerkennung der beiden genannten Unterabteilungen die Einheit der Gymnospermen als Organisationsstufe auch taxonomisch aufrechterhalten wird und weder durch eine horizontale noch durch eine vertikale Zerklüftung vollständig aufgelöst wird.

Wenn wir uns allerdings auch hier nur im sicheren merkmalsphylogenetischen Gebiet bewegen, und hinsichtlich der sippenphylogenetischen Probleme höchstens die Möglichkeit offen lassen, daß das Stadium der Samenbildung bei den *Coniferophytina* und den *Cycadophytina* selbständig erworben worden ist, dann bleibt das Faktum, daß offensichtlich diese Entwicklung recht parallel verlaufen ist: die Endstadien der Entwicklung der Samenanlagen (man denke an die Integumentbildungen, die Makrosporenentwicklung u. a.) sind prinzipiell gleich; es sind auch ähnliche Zwischenstufen (u. a. Embergers Praephanerogamen) erreicht worden. Der von Emberger verfochtene Gedanke der Praephanerogamen bedeutet ja, daß ursprünglich der Embryo mit seiner ontogenetischen Entwicklung relativ spät begonnen hat. Diese auch bei den Pteridospermen nachweisbare Stufe ist heute noch für *Ginkgo* und *Cycadeen* charakteristisch.

Am schwierigsten scheint es, die Frage nach der Entstehung des Embryosacks zu lösen. Wer hier nur die ontogenetisch „fertigen" Stadien von anderen ontogenetisch „fertigen" Stadien herleitet, für den macht diese Phylogenie allerdings große Schwierigkeit. Sobald wir uns aber der in Abb. 2 symbolisierten Hologenie bewußt werden, ist diese Schwierigkeit behoben.

Zunächst steht die Ausgangsform nach allgemeiner Überzeugung (und auch nach Fossilfunden) wohl fest: Die Makrosporen-Mutterzelle entwickelt zunächst mit Reduktionsteilung eine Makrospore, welche nach einer größeren Zahl von Kernteilungen zu einem cellulären Gameto-

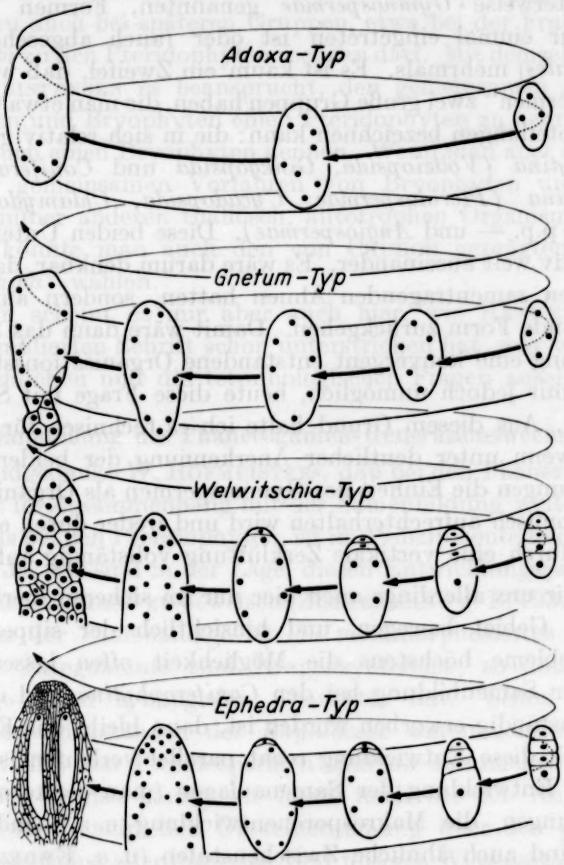


Abb. 2. Hologenie des Embryosacks, veranschaulicht durch *heutige* Formen
Unten Ausgangsform mit mehreren tausend Zellen und deutlichen Archegonien, monosporisch: *Ephedra*-Typ.
Darüber, ebenfalls monosporisch, aber weniger Zellen und Archegonien nicht mehr deutlich differenziert: *Welwitschia*-Typ.
Die beiden obersten Typen tetrasporisch: beim *Gnetum*-Typ noch basal celluläres Gewebe; beim *Adoxa*-Typ insgesamt (einschließlich der Reduktionsteilung) nur 3 Zellteilungen innerhalb der Sporenmutterzelle.
Aus ZIMMERMANN 1957, S. 174.

phyten heranwächst, wie er bei den meisten Gymnospermen (innerhalb der *Chlamydospermae* bei *Ephedra*) überliefert ist. Daß diese Ausgangsform bei den Samenpflanzen cellulär entwickelt war, ergibt sich auch aus der zuvor geschilderten Herleitung des Archegoniaten-Generations-

wechsels von einem Typ mit selbständigen Gametophyten, der ja bei den Archegoniaten ebenfalls noch überliefert ist.

Bei der weiteren Abwandlung innerhalb der Samenpflanzen, wie sie die Abb. 2 an *heutigen* Beispielen erläutert, ändert sich nicht nur die Gestalt des Gametophyten einschließlich seiner Anatomie (Zellwände!); die zeitliche Reihenfolge bzw. die Koordinierung der verschiedenen Determinationsvorgänge wird ebenfalls verändert. Eine ganz andere Zellgeneration wird bei den verschiedenen Stadien dieser Abwandlungsreihe zur Ei-Zelle determiniert. Das bedeutet, daß der Embryosack etwa der Angiospermen auf einer Art Neotenie beruht. Das heißt: noch ehe die große Zahl von Kern- und Zellteilungen (wie sie sich bei den Gametophyten der Ahnen abgespielt hat) durchlaufen worden ist, wird ein Kern des Embryosacks zur Eizelle differenziert und befruchtungsfähig.

Daß in einem solchen Embryosack, namentlich wenn wir den extrem umgebildeten tetrasporischen Typ, wie den *Adoxa*-Typ, wählen, eine Homologisierung der einzelnen Bestandteile nicht mehr möglich ist, scheint selbstverständlich. Und doch ist der phylogenetische Weg auch hier ganz klar. Wir haben eben den Fall einer typisch heterochronen Entwicklung. Das heißt: Wenn im Zusammenhang mit heteromorpher Entwicklung auch die ursprüngliche Homochronie der einzelnen Determinationsvorgänge (und damit meist auch die Homotopie) verlorengegangen ist, wenn also auch bei klar erkennbarer phylogenetischer Gesamtentwicklung (wie beim Embryosack der Samenpflanzen) die Organe heteromorph und heterochron determiniert werden, dann wird meines Erachtens eine ins Einzelne gehende Homologisierung der Teile dieses abgewandelten Organs unmöglich; dann ist es ein Streit um Worte, in welchen Gebilden man etwa das Archegonium der Ahnen sucht. Die klassischen Fälle der Homologie sind ja diejenigen der heteromorphen Abwandlung bei erhaltener Homotopie und Homochronie.

Literatur

Christensen, T.: Remark on the Phylogeny of the Bryophyta. Bot. Tidsskr. **53**, 53—58 (1957). — Church, A. H.: Thalassiophyta. Oxf. Bot. Mem. No 3, 1919. — Emberger, L.: Les Préphanérogames. Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 11, **10** 1950. — Renner, O.: Zur Terminologie des Generationswechsels. Biol. Zbl. **36**, 337—374 (1916). — Zimmermann, W.: Objektive Form für Stammbäume und ähnliche phylogenetische Darstellungen. Aus der Heimat **45**, 245—251 (1932). — Evolution. Geschichte ihrer Probleme und Erkenntnisse. Freiburg u. München 1953. — Phylogenie des Archegoniaten-Generationswechsels. Fedd. Rep. **58**, 283—307 (1955). — Phylogenie der Blüte. Phyton **7**, 162—182 (1957). — Phylogenie der Pflanzen, 1. Aufl. 1930, 2. Aufl. 1958 (im Druck).

Prof. Dr. W. Zimmermann,
Institut für angewandte Botanik der Universität, (14b) Tübingen, Wilhelmstr. 5

Planta, Bd. 51, S. 518—543 (1958)

ASSIMILATIONSVERMÖGEN UND RESPIRATION DER FICHTE (PICEA EXCELSA LINK) IN VERSCHIEDENER HÖHENLAGE UND DER ZIRBE (PINUS CEMBRA L.) AN DER ALPINEN WALDGRENZE*

Von

ARTHUR PISEK und ERICH WINKLER

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Dezember 1957)

Wenn man die Lage sommergrüner Pflanzen mit jener der Immergrünen am selben Ort vergleicht, liegt es nahe a priori anzunehmen, die Immergrünen wären insoferne klar im Vorteil, als für sie die Vegetationszeit verlängert ist: sie brauchen im Frühjahr nicht erst auszutreiben, um CO_2 assimilieren zu können, und vermögen bei frostfreiem Wetter wahrscheinlich weit in den Herbst hinein, vielleicht sogar mitten im Winter, jeden günstigen Tag für die Photosynthese zu nützen.

Der erste Versuch, den Tageslauf der Netto-Assimilation der Fichte auch während des Winterhalbjahres am Standort an einigen charakteristischen Tagen zu überprüfen (PISEK und TRANQUILLINI 1954), bestätigte die Vermutung im wesentlichen, wenigstens für Tallagen unseres Untersuchungsgebietes. Dank des damals milden Spätherbstes und Vorwinters waren die Fichten bis in den Dezember und dann wieder im März photosynthetisch erstaunlich aktiv. Bei Temperaturen unter Null Grad konnte mit der damals verwendeten CO_2-Bestimmungstechnik leider nicht gearbeitet werden, so daß das Verhalten der Bäume in den kälteren Monaten noch zu untersuchen blieb.

Wie weit die Pflanze unter winterlichen Verhältnissen am Licht Kohlenstoff im Überschuß binden kann (Netto-Assimilation) und wieviel, das hängt, rein theoretisch betrachtet, vom Licht sowie von der Lage des Temperaturminimums und der Form der Temperatur-Abhängigkeitskurve der Netto-Assimilation ab, worüber wir im allgemeinen nicht viel und hinsichtlich der Immergrünen besonders wenig wissen. Wir haben uns daher auch mit diesen Fragen experimentell zu beschäftigen begonnen und u. a. das Temperaturminimum der Netto-Assimilation im auslaufenden Winter durch Laboratoriumsversuche (Philips Warmtonröhren TL 29, 3000 Lux — höhere Lichtintensität war z. Z. nicht erreichbar) zu ermitteln versucht (PISEK und REHNER 1958). Das *Minimum* schwankt um diese Zeit von Art zu Art zwischen —2 bis

* Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. HARDER zu seinem 70. Geburtstag gewidmet.

—7° C, liegt merkwürdigerweise bei Mediterranen wie *Arbutus*, *Olea* und *Laurus* (Mitte Februar) am tiefsten und hält sich bei *Picea excelsa* in Tal- und Berglage, in Übereinstimmung mit den beiläufigen Angaben von Ålvik (1939) und Zeller (1951), um —4° (bei —5° schon CO_2-Ausscheidung!), ebenso bei *Pinus silvestris*. *Pinus cembra* arbeitete nach Tranquillini (1957) an der Waldgrenze im Herbst positiv, solange die Nadeltemperatur über —4° blieb, d. h. solange sich in den Nadeln kein Eis bildete. Der Gefrierpunkt der Zirbennadeln schwankt nämlich je nach Wassergehalt (Jahreszeit) im Winter zwischen rund —3° und —5°; bei —6° bis —8° friert alles nicht „gebundene" Wasser aus (Tranqullini und Holzer 1958).

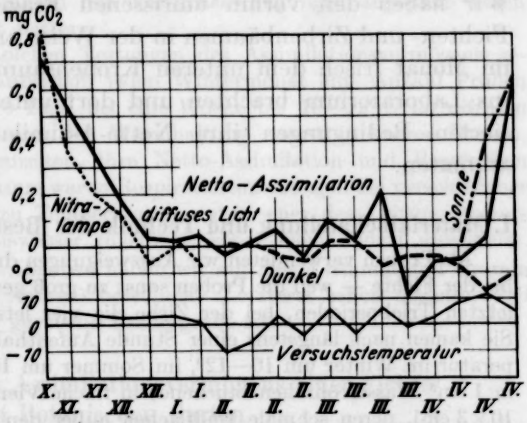


Abb. 1. CO_2-Gaswechsel (mg CO_2/g Frischgewicht × Stunde) einjähriger Triebe von der SW-Seite 16—17jähriger *Pinus silvestris* im Winter (Leningrad). Nach Iwanow und Orlowa (1931)

Das breite *Temperaturoptimum* der Fichte liegt nach unserer Erfahrung im Sommer zwischen 8 und 15° C, fast gleich wie es sich in Tranquillinis (1955/56) Versuchen bei Jungzirben an der Waldgrenze herausstellte, als er ihren Gaswechsel am Standort im Spätsommer laufend registrierte. Kein Zweifel also, daß Fichte, Zirbe und Kiefer bei ganz schwachem Frost am Licht die gleichzeitige Atmung überkompensieren und wenige Grade über dem Gefrierpunkt zu beträchtlichem Netto-Gewinn ausreichen können.

Es fragt sich jedoch, wie es im Freiland unter den dort waltenden Bedingungen um die photosynthetische Aktivität und die C-Bilanz tatsächlich bestellt ist. Wie benimmt sich der Baum im Wechsel des Klimas während des Winterhalbjahres; wird sein Verhalten rein von der augenblicklichen Wetterlage bestimmt, und die Winterruhe, wenn man überhaupt von solcher reden kann, nur von dieser erzwungen? Wieweit wirkt die augenblickliche Temperaturlage etwa nach, oder kommt gar eine inhärente Komponente hinzu?

Die ersten brauchbaren Untersuchungen, die in dieser Richtung an Nadelbäumen angestellt wurden, stammen von Iwanow und Orlowa (1931). Sie zeigten, daß die Kiefer *(Pinus silvestris)* bei Petersburg nicht imstande ist, mit Überschuß zu assimilieren, sobald die Temperatur nur wenig unter Null Grad hält (Abb. 1). Frisch abgeschnittene Zweigproben gaben — in 20° und 25000 Lux übertragen — in den

Monaten Januar bis April zunächst stets CO_2 ab und begannen erst, nachdem sie 3—4 Tage in 15° verweilt hatten, CO_2 aufzunehmen.

Tranquillini (1957) suchte über das Winterverhalten von spontan aufgegangenen Jungzirben an der alpinen Waldgrenze (Oetztal) Auskunft zu erhalten, indem er ihren Gaswechsel unmittelbar an diesem Standort mit dem Ultrarot-Absorptionsschreiber (URAS) dauernd registrierte und mit den fortlaufenden Aufzeichnungen der Nadel- und Bodentemperatur, des Klein- und Großklimas daselbst in Beziehung brachte. Es gelang ihm, das Bild des Verhaltens bis ins einzelne durchzuzeichnen. *Wir* haben den vorhin umrissenen Fragenkomplex an erwachsenen Fichten- und Zirbenbäumen in der Weise angepackt, daß wir mehrmals im Monat frisch dem unteren Kronensaum entnommene Zweigproben ins Laboratorium brachten und dort unter stets gleichen, standardisierten Bedingungen ihre Netto-Assimilation und Respiration bestimmten.

I. Materialbehandlung und Technik der Bestimmung des CO_2-Umsatzes

Als Proben verwendeten wir Auszweigungen dritter oder höherer Ordnung, die bei der Fichte — weil die Proben sonst zu groß geworden wären — nur die beiden letzten Triebperioden, bei der Zirbe die vier letzten Nadeljahrgänge umfaßten. Sie kamen nach längstens einer Stunde Aufenthalt im Vorbereitungsraum (Temperatur im Winter um 10—12°, im Sommer um 16—18° C) mit der Schnittfläche in 1 cm^3 Wasserröhrchen tauchend, in flache Vierkant-Plexiglasrezipienten (18 × 10 × 3 cm), deren schmale Endflächen außer den Anschlußstutzen für die Luftdurchleitung auch Bohrungen zum allfälligen Einführen von Kabel für Widerstandsthermometer oder Thermoelemente hatten.

Die Lichtstärke am Ort der Proben war 10000 Lux, die Lichtquelle Philips Warmtonröhren TL 29, deren Lichtqualität unter der damaligen Auswahl noch am ehesten dem Sonnenlicht entsprach (Kennlinien bei Pisek und Winkler 1956); 10000 Lux ist nach Tranquillinis Erfahrung an Jungzirben, die im Schatten älterer Bäume auf einer Lichtung wuchsen, für diese fast optimales, zur Testung selbst von Sonnennadeln also jedenfalls einigermaßen ausreichendes Licht. Gern hätten wir außerdem eine größere Intensität von etwa 20000 Lux verwendet, doch war dies zur Zeit noch nicht möglich.

Die Rezipienten kamen in ein großes Wasserbad, durch welches ständig langsam kaltes Wasser strömte. Mit Rührer, Kontaktthermometer und Heizelement wurde seine Temperatur mit einer Schwankung von höchstens ± 0,1° bei 11° C konstant gehalten. Die mittlere Nadeltemperatur war dann etwa 1° höher, also 12° C, d. i. nach all unserer Erfahrung ausgesprochen optimal, wofür auch spricht, daß Vorversuche in der hier eingeschlagenen Richtung, bei denen wir mit 22° C arbeiteten[1], im Winter und Sommer ausnahmslos eine viel schlechtere Netto-Ausbeute bei ungefähr doppelt so hoher Respiration ergaben. Als Meßinstrument diente ein URAS der Badischen Anilin- und Sodafabrik samt Zubehör[2], im wesentlichen in der schon von Tranquillini (1952) beschriebenen Anordnung. An den Gasumschalter

[1] Weil diese Temperatur, die dem mittleren täglichen Hochsommer-Maximum auf dem Patscherkofel entspricht, sich ohne besondere Einrichtung leidlich einhalten ließ.

[2] Für die Überlassung sind wir der Forsttechnischen Abteilung der hiesigen Wildbach- und Lawinenverbauung zu Dank verpflichtet.

waren gewöhnlich 2—3 Assimilations-, 1—2 Dunkelrespirationsrezipienten und 1 Kontroll-Luftleitung angeschlossen. Die Luft wurde aus einem möglichst wenig betretenen Sonderraum bezogen, der durch ein Oberlichtfenster mit der Außenluft in Verbindung stand. Die Durchströmung betrug 30 Liter pro Minute; mehr förderten die verwendeten Kapselpumpen nicht; doch genügte dies selbst bei lebhafter Sommerassimilation, weil die Zweigproben dann entsprechend kleiner gewählt wurden, um volle Assimilation zu gewährleisten. Bei schwachem Wintergaswechsel wurde die Empfindlichkeit der Anzeige entsprechend vergrößert.

Die Punkte auf dem Registrierstreifen wurden erst von der Zeit an ausgewertet, da sie nicht mehr streuten, sondern völlig gleichmäßig lagen, was etwa eine halbe Stunde nach dem Anschluß des Rezipienten an das Analysengerät der Fall war. So lange brauchte es, bis die Pflanzen den Versuchsbedingungen angepaßt waren und das Gerät sich eingespielt hatte.

Zur Ergänzung des aus solchen Testungen des Assimilationsvermögens gewonnenen Bildes haben wir außerdem jeden Wintermonat eine Anzahl Proben im Vorbereitungsraum mehrere Tage bis eine Woche bei 10—12° C im diffusen Tageslicht gehalten und während der Warmhaltung zuerst in kurzen Pausen, späterhin mit langen Zwischenzeiten, ihre Netto-Assimilation und Respiration gemessen. — Ein Sonderprogramm waren Respirationsmessungen bei verschiedener Temperatur. Soweit es hierzu Temperaturen unter jener des Leitungswassers brauchte, wurde dem Bad Eiswasser zugeführt, sonst nach Bedarf aufgeheizt.

Alle CO_2-Aufnahmen und -Abgaben haben wir auf mg je Stunde und Gramm Trockengewicht (Nadeln und Achsen) berechnet. Letzteres schon deshalb, weil es für Bilanzkalkulationen die gegebene Bezugsgröße ist.

II. Jahresgang des Assimilationsvermögens einer Fichte im Botanischen Garten

Ziemlich freistehender, etwa 50 Jahre alter Baum, 15 m hoch, Stammumfang in Brusthöhe 170 cm, ringsum gleichmäßig locker beastet.

1. Sonnentriebe

Die jahreszeitlichen und kurzfristigen Schwankungen des Assimilationsvermögens (Abb. 2) der Sonnennadeln spiegeln — auf den ersten Blick hin beurteilt — getreu das Auf und Ab des Temperaturklimas. Solange es bloß vereinzelt schwachen Nachtfrost bis etwa —3° C gibt, bleibt das Assimilationsvermögen weit in den Spätherbst (November) hinein auf sommerlicher Höhe. Folgen aber ein paar solche Frosttage unmittelbar nacheinander, wie um den 20. des Monats, dann sinkt es merklich. Im ersten kräftigen Kältestoß gegen das Monatsende ist die Netto-Assimilation schon binnen dreier Eistage (Minimum —10 bis —12°) auf nahezu Null heruntergestürzt. Aber es genügt 1 Woche mit Nachttemperaturen um Null Grad und Tagesmaxima von 5—10° C, daß sich die photosynthetische Leistungsfähigkeit vom ersten Überfall des Winters ausgiebig erholt. Zu völliger Wiederherstellung kommt es allerdings nicht mehr. Das Assimilationsvermögen erreicht nur mehr etwa $^2/_3$ seines Ausgangsniveaus; es bleibt dabei stehen, solange die täglichen Temperaturminima sich ganz vorwiegend um Null Grad halten, kein anhaltender

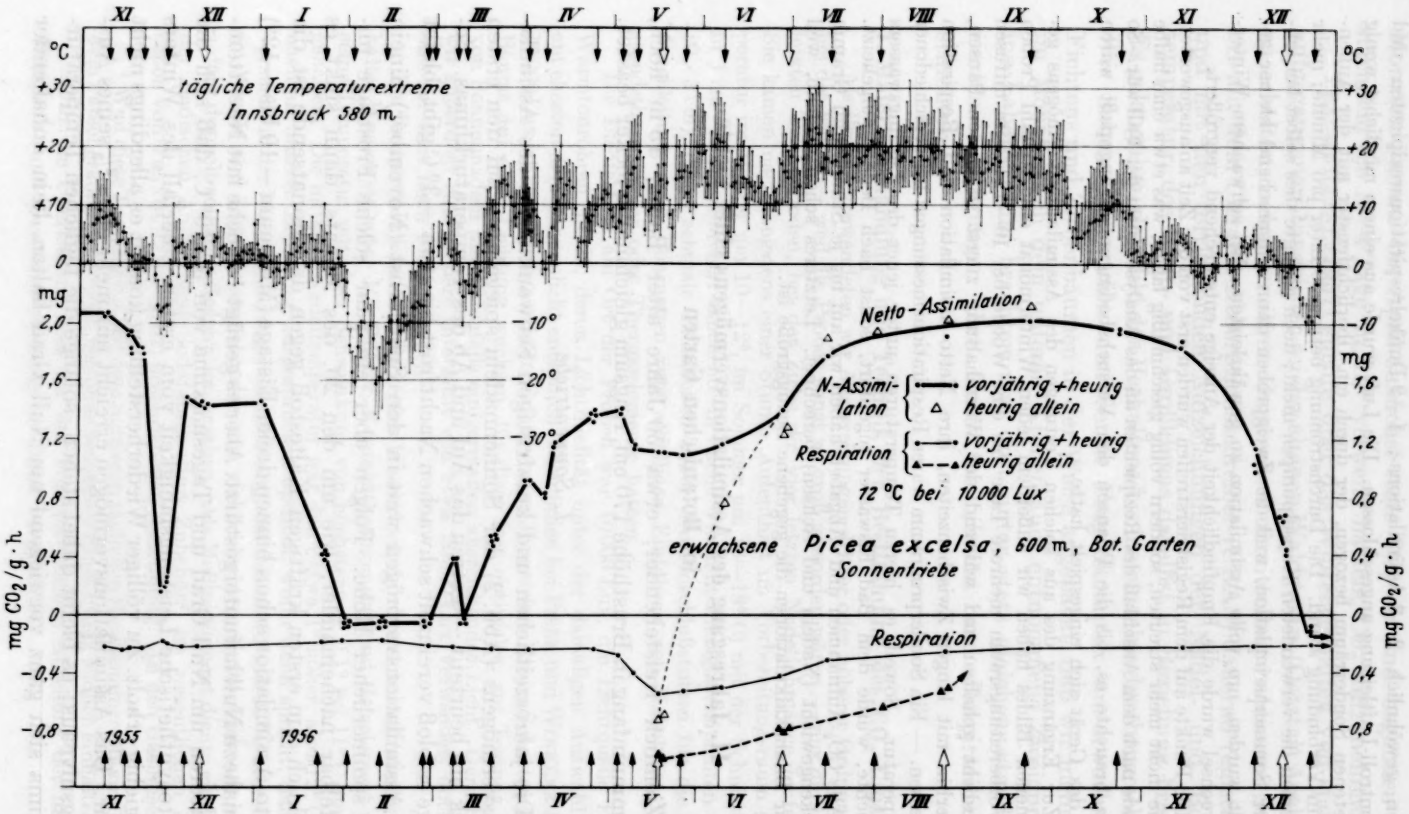


Abb. 2. *Picea excelsa*, freistehender erwachsener Baum im *Botanischen Garten* in Innsbruck, 600 m. Jahresgang des Assimilationsvermögens und der Respiration (mg CO_2/g Trockengewicht und Stunde; 12° C, 10000 Lux) von *Sonnenzweigen* des südseitigen Kronenrandes (jeweils letzte 2 Jahrgänge). Oben: tägliche Temperaturextreme der meteorologischen Station Innsbruck-Stadt. Pfeile markieren die Untersuchungstage

schwacher Frost einfällt und die Mitteltemperaturen mindestens knapp positiv sind. Sonst sinkt es rasch (Ende Januar). Anfang Februar — 3 Tage nach Beginn strengen Frostes — ist die C-Bilanz bei unseren Meßbedingungen (wie immer 12°, 10000 Lux) völlig negativ; doch scheiden die Zweigproben am Licht kaum halb so viel CO_2 aus wie im Dunkeln. Die Photosynthese ruht also keineswegs, aber sie ist so schwach, daß sie nicht einmal das Atmungs-CO_2 vollständig zu reassimilieren vermag. Der Tiefstand hält während des ganzen berüchtigt kalten Februar 1956 an. Die darauffolgende, vorübergehende Frühjahrsregung des Klimas zeichnet sich im Jahresgang der Kurve des Assimilationsvermögens als Aufwärtszacke ab, ein vorübergehend schwacher Rückschlag (Anfang April) während der endgültigen Wendung zur Wärme erscheint pünktlich als Abwärtsschwankung im sonst nunmehr durchgehenden Anstieg des Assimilationsvermögens.

Im einzelnen kann man sagen, daß Netto- wie Brutto-Assimilation in den Wintermonaten, sobald das Tagesminimum unter Null Grad sinkt, noch einige Stunden, nachdem die Zweigproben aus dem Freien in 10—12° C gebracht wurden, mit der Tiefe, der Dauer und der Kontinuität des vorausgegangenen Frostes schwanken. Vereinzelter, schwacher Frost bis etwa —4° läßt die photosynthetische Leistung ziemlich unbehelligt, sofern die Tagesmittel 2—3° C nicht unterschreiten (12. 12. 55 bis 2. 1. 56). Derselbe schwache Nachtfrost setzt aber bei 2—4° C Tagesmittel die Photosynthese wesentlich herab, wenn er mehrmals unmittelbar hintereinander sich einstellt (2.—23. 1. 56). Schon 2 Eistage hintereinander mit Minimum gegen —10° C genügen, um die Photosynthese derart herunterzudrücken, daß sie nur mehr zur Kompensation bzw. zur Reassimilation des Atmungs-CO_2 imstande ist (Spalten vermutlich jetzt geschlossen, 12. 3.); bei länger dauerndem stärkeren Frost reicht sie nicht einmal dazu aus.

Nachdem das Assimilationsvermögen im Vorfrühling rasch zugenommen hat, scheint es im Frühling nochmals zurückgeworfen. Aber diese über Mai und Juni sich hinziehende Delle im Jahresgang (Abb. 2) hat nichts mit Kaltwetter zu tun, sondern ist dadurch verursacht, daß wir nunmehr die getesteten zwei letzten Nadeljahrgänge zur Hälfte gewechselt hatten. Bis 3. Mai, d. i. solange die Winterknospen geschlossen blieben, verwendeten wir die Jahrgänge 1954 und 1955, ab 7. V. hingegen Zweigenden mit den Triebperioden 1955 und 1956. Am 7. V. ragten die heurigen Triebe (1956) als kurze grüne Nadelpinsel von erst 8 mm Länge aus den Knospenschuppen; noch 1 Woche später waren sie in diesem Pinselstadium, atmeten dabei außerordentlich intensiv (Abb. 2 vollschwarze Dreiecke), während ihre Photosynthese, wohl hauptsächlich infolge Lichtmangel, im Innern des Büschels so gering war, daß sie nicht entfernt den durch die gleichzeitige Atmung

verursachten Stoffverlust deckte. Die Bilanz der zarten Jungtriebe ist daher zunächst sehr negativ (helle Dreiecke in Abb. 2). Sie bessert sich rasch mit dem Auseinanderrücken und weiter mit dem allmählichen Reifen der Nadeln, kommt aber erst im Juli auf das endgültige Niveau. Diese anfänglich schwache Photosynthese der Jungtriebe bei gleichzeitig starker Respiration schlägt in der Kurve des Assimilationsvermögens der Gesamtproben als kräftige Minderung und noch lange als Verzögerung des Anstieges durch. Von Juli ab bleibt die Assimilation dann unter den gegebenen Verhältnissen bis in den Spätherbst fast gleich und ist ebenso hoch wie im vorausgegangenen Jahr zur selben Zeit.

Entfernt man die heurigen Zuwächse (1956) und prüft weiter Triebspitzen, die aus den beiden früheren Jahrgängen (1954 und 1955) allein bestehen, so findet man, daß das Assimilationsvermögen schon von Ende April an nur mehr ganz wenig und gleichmäßig steigt und im Kurvenscheitel fast $^1/_4$ gegenüber dem Vorjahr zurückbleibt (Abb. 3). Darin kommt das Altern der Jahrgänge im Vergleich zur überlegenen Aktivität der heurigen Nadeln zum Ausdruck. Letztere waren im Juli längst voll ausgereift und assimilierten also nicht etwa bloß scheinbar — infolge geringen Trockengewichtes — relativ kräftig.

Die heurigen Nadeln von *Picea canadensis* (White Spruce) und *Abies balsamea* (Balsam Fir) arbeiten nach CLARK (1956) wie die unserer Fichte ab Mitte Juni mit Gewinn, erreichen aber erst im September ihr größtes Assimilationsvermögen, womit sie dann an der Spitze aller Jahrgänge stehen. Doch dauert die Unterproduktion der Heurigen im Frühling so lange, daß sie erst im folgenden Jahr als die Hauptstätten der Photosynthese gelten können.

Abgesehen von diesen durch Entwicklung und Alter bedingten Besonderheiten spiegeln die Schwankungen des Assimilationsvermögens mit höchstens 2—3 Tagen Phasenverzögerung getreu jene des Temperaturklimas am Standort, aber doch nur in gewissen Grenzen. Sie folgen diesem nämlich nur soweit, als die Tagesminima und Mittel der Temperatur zwischen wenigen Graden über und wenigen unter dem Gefrierpunkt schwanken. Bleibt aber die Temperatur in der Übergangszeit vom Herbst zum Winter und umgekehrt, sowie im Sommer dauernd über Null, so findet man das Assimilationsvermögen gleich alter, ausgereifter Nadeln gleich, ob nun die Temperaturextreme während der unmittelbar vorausgegangenen Tage sich zwischen etwa 0 und 10° oder zwischen 10 und 20° hielten; und es macht im Winter, wenn die Temperatur ständig unter Null Grad bleibt, wenig aus, ob die Minima bis —10 oder ob sie bis —20° heruntergehen. Unsre nordisch alpinen Coniferen halten ja im Hochwinter ohne Schaden strengste Kälte aus (PISEK und SCHIESSL 1947). Doch wird vermutlich bei Unterschreiten des Gefrierpunktes der Nadeln (Zirbe —2° bis —5°) und besonders, sobald sie sich so tief abkühlen, daß all ihr freies Wasser zu Eis wird (Zirbe —6° bis —8°, TRANQUILLINI

und HOLZER 1958), der Assimilationsapparat *vorübergehend* in Mitleidenschaft gezogen. Die Photosynthese reicht dann bestenfalls noch zur Kompensation der gleichzeitigen Atmung, schließlich erlahmt sie völlig.

Das *Respirationsvermögen* wird von vorübergehenden Klimaschwankungen wenig beeinflußt. Daß es beim Austreiben der Knospen im Frühjahr auf mehr als das Doppelte ansteigt, beruht, wie erwähnt, auf dem großen Anteil der Knospen bzw. heurigen Triebe an der Gesamtmasse unserer Proben. Im übrigen ist die Respiration mitten im Winter um mindestens $^1/_3$ schwächer als im Hochsommer, wovon noch zu reden sein wird.

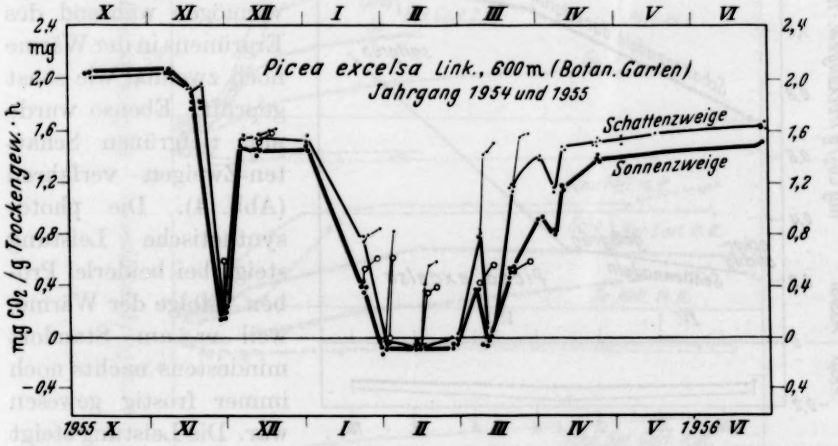


Abb. 3. *Picea excelsa*, Botanischer Garten. Wie Abb. 2; Assimilationsvermögen (mg CO_2/g Trockengewicht und Stunde, 12° C, 10000 Lux) von Sonnen- und Schattentrieben. Außerdem ist eingetragen, wieviel die Assimilation während einer Woche zunimmt, wenn die Proben ständig bei 10—12° C gehalten werden. Im Sommer ist das Assimilationsvermögen tiefer als im vorausgegangenen Oktober, weil ab Anfang Mai der heurige Jahrgang der Proben weggeschnitten wurde

2. Schattentriebe (Abb. 3). *Schwund und Regeneration des Chlorophylls*

Im wesentlichen gilt das vorhin von den Sonnentrieben, von denen bisher allein die Rede war, Gesagte auch für die Proben aus dem Schatten an der Nordseite und im Innern der Krone. Doch bleiben die Schattentriebe vom Spätherbst bis zur Kälteperiode im Februar etwas leistungsfähiger und werden im beginnenden Frühling viel rascher hochaktiv. Hauptursache dieser Überlegenheit der Schattennadeln ist zweifellos, daß sie während des Winters ihr Chorophyll leidlich ungeschmälert behalten, was man ihnen ohne weiteres ansieht. Sie bleiben nämlich verhältnismäßig frisch grün, während die Sonnennadeln sich früher oder später gelblich verfärben, im äußersten Falle gegen ockergelb umschlagen und erst im Frühjahr wieder ergrünen. Nach den Analysen des Chlorophyllgehaltes von TRANQUILLINI (1957), der ihn bei Zirben an der Waldgrenze von Oktober bis Mai mehrmals untersuchte,

entspricht bei dieser Konifere dem Mißfarbigwerden Abnahme, dem Wiederergrünen Zunahme des Chlorophyllgehaltes. Es wird bei der Fichte nicht anders sein.

Der Abbau ist zwar reversibel, aber die Regeneration braucht selbst unter günstigsten Verhältnissen im Frühjahr fast 2 Wochen. Mit ihr wächst auch das Assimilationsvermögen wieder. Wir haben Ende April stark verfärbte Sonnenzweige von Bergfichten nach der Sofortmessung eingefrischt im warmen Zimmer stehengelassen und ihr Assimilationsvermögen während des Ergrünens in der Wärme noch zweimal wie sonst geprüft. Ebenso wurde mit tiefgrünen Schatten-Zweigen verfahren (Abb. 4). Die photosynthetische Leistung steigt bei beiderlei Proben infolge der Wärme, weil es am Standort mindestens nachts noch immer frostig gewesen war. Die Leistung steigt aber bei den Sonnennadeln mit deren Ergrünen viel mehr als bei den anderen, die entsprechend ihrer tiefgrünen Farbe, die sich nicht merklich änderte, anfangs weit, schließlich nur wenig voran sind. Die Schattentriebe ersparen sich die Chlorophyllregeneration mindestens zum großen Teil. Daher sind sie den Sonnentrieben im vorgeschrittenen Winter immer und besonders weit dann voran, als nach der langen und strengen Februarkälte die Umstellung zum Sommer einsetzte. Auch wenn man im Winter frisch eingebrachte Zweige bei natürlichem Licht-Dunkelwechsel 1 Woche in konstant 10—12° hält und währenddessen wiederholt prüft, findet man die Schattennadeln immer im Vorsprung.

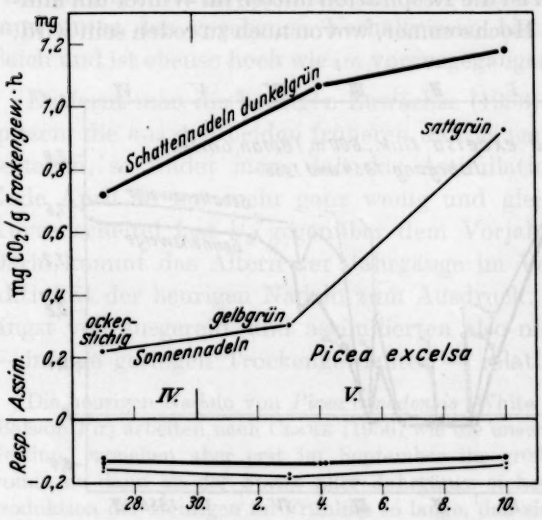


Abb. 4. *Picea excelsa*, Netto-Assimilation und Respiration von Schatten- und Sonnentrieben einer Fichte nicht weit unter der Waldgrenze (Mutterer Alm 1650 m), die vom 27. IV. bis 10. V. 55 bei 18—22° C im Glashaus standen. Die Assimilation der zuerst ockerstichigen Sonnentriebe nimmt besonders in der 2. Woche der Warmhaltung mit dem Ergrünen viel stärker zu als jene der von Anfang an dunkelgrünen Schattentriebe

3. Änderung des Assimilationsvermögens bei Warmhaltung im Winter

In Abb. 3 sind die bei Warmhaltung gefundenen Werte durch dünne Linien mit den zugehörigen Werten der Grundkurve verbunden; in Abb. 5 (durchgezogene Kurven) die Zeitabszissen gestreckt, wodurch

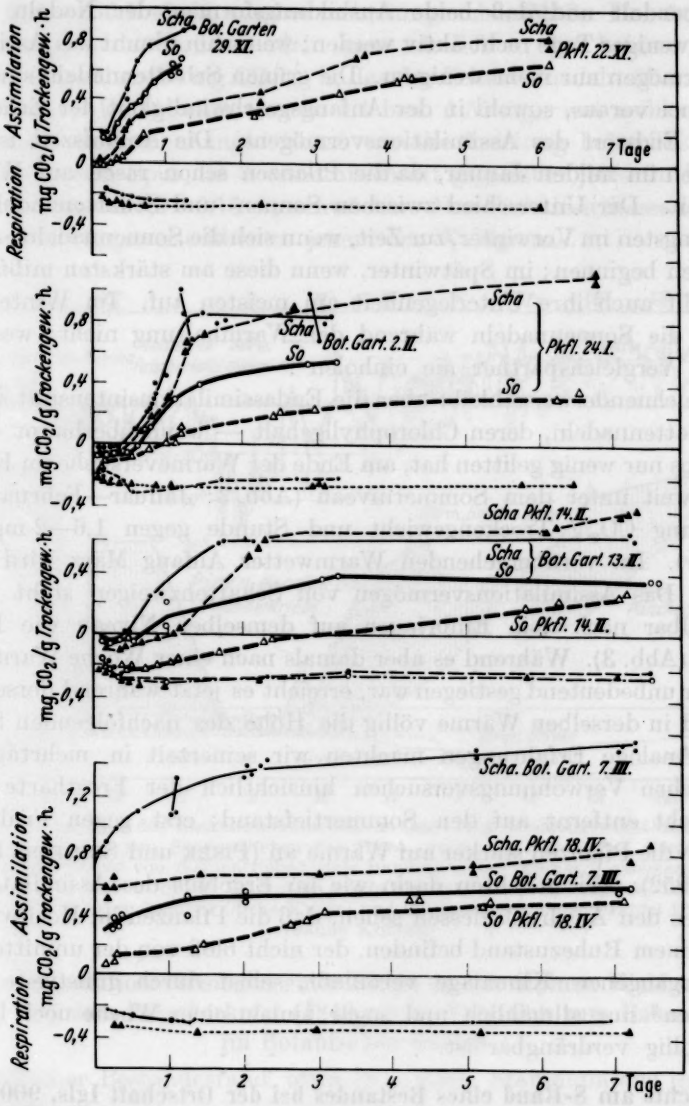


Abb. 5. *Picea excelsa*. Botanischer Garten und Waldgrenze auf dem Patscherkofel, Netto-Assimilation und Respiration wie in Abb. 2. Wenn man Proben aus dem Freiland im Winter einige Tage bis eine Woche bei 10—12° C hält, nimmt ihr Assimilationsvermögen (12° C, 10000 Lux) in verschiedener Weise und verschieden rasch zu, je nachdem ob sie im milden Frühwinter, zur Zeit strengen Frostes oder im Spätwinter entnommen wurden. Schattentriebe, Botanischer Garten ●——●, Patscherkofel ▲——▲; Sonnentriebe, Botanischer Garten ○——○, Patscherkofel △——△

der Verlauf der Erholung während des Aufenthaltes in der Wärme deutlicher wird. Man sieht, daß die Respiration während des 1. Halbtages etwas ansteigt, besonders im Februarversuch (Abb. 5), dann langsam

zurückpendelt und daß beide Ausbildungsformen der Nadeln stets binnen weniger Tage recht aktiv werden; weiterhin nimmt das Assimilationsvermögen nur mehr wenig zu. Die grünen Schattennadeln sind dabei immer voraus, sowohl in der Anfangsgeschwindigkeit der Erholung wie im Endwert des Assimilationsvermögens. Die Anlaufszeit ist am kürzesten im milden Januar, da die Pflanzen schon rasch auf Wärme reagieren. Der Unterschied zwischen Sonnen- und Schattennadeln ist am geringsten im Vorwinter, zur Zeit, wenn sich die Sonnennadeln erst zu verfärben beginnen; im Spätwinter, wenn diese am stärksten mißfarbig sind, fällt auch ihre Unterlegenheit am meisten auf. Im Winter ergrünen die Sonnennadeln während der Warmhaltung nicht; weshalb sie ihre Vergleichspartner nie einholen[1].

Bezeichnenderweise bleibt aber die Endassimilationsintensität selbst der Schattennadeln, deren Chlorophyllgehalt — wenn überhaupt — so zweifellos nur wenig gelitten hat, am Ende der Wärmeversuche im Hochwinter weit unter dem Sommerniveau (Abb. 3: Januar—Februar 0,6 bis 0,8 mg CO_2/g Trockengewicht und Stunde gegen 1,6—2 mg im Sommer). Im vorübergehenden Warmwetter Anfang März wird dies anders. Das Assimilationsvermögen von Schattenzweigen steht jetzt unmittelbar nach dem Einbringen auf demselben Niveau wie Ende Januar (Abb. 3). Während es aber damals nach einer Woche Warmhaltung nur unbedeutend gestiegen war, erreicht es jetzt während derselben Zeit und in derselben Wärme völlig die Höhe des nachfolgenden Sommers. Analoge Erfahrungen machten wir seinerzeit in mehrtägigen winterlichen Verwöhnungsversuchen hinsichtlich der Frosthärte: sie sank nicht entfernt auf den Sommertiefstand; erst gegen Frühjahr sprachen die Pflanzen stärker auf Wärme an (Pisek und Schiessl 1947, Pisek 1952). Wir möchten darin wie im Ergebnis des Assimilationsversuches den Ausdruck dessen sehen, daß die Pflanzen im Hochwinter sich in einem Ruhezustand befinden, der nicht bloß von der unmittelbar vorausgegangenen Klimalage veranlaßt, selbst durch günstigste Bedingungen[2] nur allmählich und sogar binnen einer Woche noch lange nicht völlig verdrängbar ist.

III. Fichte am S-Rand eines Bestandes bei der Ortschaft Igls, 900 m

Kräftiger, vollbeasteter und derb benadelter Baum, etwa 70 Jahre, gegen 20 m hoch, Stammdurchmesser in 40 cm Stubbenhöhe 80 cm.

Der Baum verhält sich grundsätzlich wie jener im Botanischen Garten, der Kurvenzug ist ganz ähnlich, nur erholte er sich nach dem

[1] Man könnte die Enddifferenz (um wenige % vermindert, d. i. nämlich der konstante Unterschied gegenüber den Sonnennadeln auch im Sommer) geradezu als Maß dafür nehmen, was der Chlorophyllabbau für die Photosynthese ausmacht.

[2] Die Versuchstemperatur (12°) liegt mitten im Bereich des Optimums der Netto-Assimilation der Fichte

ersten Froststoß Ende November nicht im gleichen Maße. Das Assimilationsvermögen der Sonnennadeln kam nämlich in den beiden folgenden Monaten über 0,8 mg CO_2/g · h, das der Schattennadeln über 1,2 mg nicht hinaus (Botanischer Garten 1,4 bzw. 1,55 mg), was wohl mit der Höhenlage zusammenhängt. Sonst war die Leistung beim Testen im Winter nur eine Spur, im Sommerabschnitt gegenüber jener im Botanischen Garten um 0,2—0,15 mg schwächer. Das Verhalten dieses Baumes leitet andeutungsweise über zu jenem der Waldgrenze.

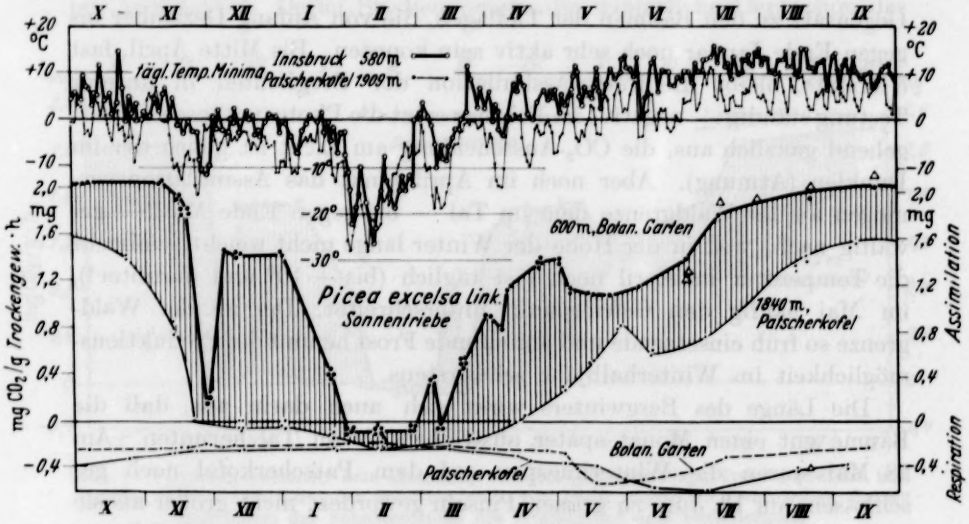


Abb. 6. Unterschied des Assimilationsvermögens (mg CO_2/g Trockengewicht und Stunde, 12° C, 10000 Lux) von Sonnentrieben der *Picea excelsa* im *Botanischen Garten*, 600 m (dicke Kurven) *und* von Sonnentrieben eines Baumes an der *alpinen Waldgrenze* auf dem Patscherkofel, 1840 m (dünne Kurve) im Laufe des Jahres. Oben: Tägliche Temperaturminima, Innsbruck-Stadt (dicke Kurve) und Wetterstation Patscherkofel 1909 m (dünne Kurven)

IV. Assimilationsvermögen einer Fichte an der alpinen Waldgrenze auf dem Patscherkofel (1840 m) im Vergleich zum Baum im Botanischen Garten

Südlicher Bestandesrand, etwa 10 m hoch, Stammumfang in Brusthöhe 124 cm.

Während es im Tal (Daten Innsbruck-Stadt) im Herbst nur um die Wende Oktober—November kurz vorübergehend, dann wieder ab 16. November schwachen Frost gab, der sich zu Ende des Monats bis —12,6° C verstärkte und dann wieder rasch abflaute, gingen die Tagesminima auf dem Patscherkofel schon im Oktober mehrmals und stets mehrere Tage unter Null (Abb. 6). Nach mehrtägigem Warmwetter zu Anfang November sanken sie hier kurz nach der Monatsmitte auf —13°, gegen Ende bis —16° C, worauf es bis Ende April frostfreie Tage nur mehr als

vereinzelte Ausnahme gab. Die Tagesminima liegen abgesehen von den ersten und letzten Novembertagen und der zweiten Februarhälfte (Kaltluftsee in der Niederung) fast ständig unter denen von Innsbruck, im März und April manchmal bis zu 10° tiefer. Die absolute Mindesttemperatur war allerdings nur 2° unter der von Innsbruck (nämlich —28,8°).

Dem wesentlich kälteren Klima an der Waldgrenze entspricht, daß das Assimilationsvermögen der *Sonnennadeln* dort oben zeitiger zurückgeht als im Tal, rund eine Woche früher auf Null abgestürzt ist (22. November) und sich dann während des Winters nicht mehr erholt, ganz im Gegensatz zu den Bäumen der Tieflagen, die von Anfang Dezember bis gegen Ende Januar noch sehr aktiv sein konnten. Bis Mitte April, fast 5 Monate, bleibt die Netto-Assimilation der Bergfichten in unserer Testung ständig ± negativ; im Februar setzt die Photosynthese vorübergehend gänzlich aus, die CO_2-Ausscheidung am Licht ist gleich der im Dunklen (Atmung). Aber noch im April hinkt das Assimilationsvermögen an der Waldgrenze dem im Tal — bis gegen Ende Mai! — gewaltig nach, weil in der Höhe der Winter lange nicht weicht, vielmehr die Temperatur im April noch fast täglich (bis —10° und darunter!), im Mai häufig den Gefrierpunkt unterschreitet. Der an der Waldgrenze so früh einsetzende und anhaltende Frost hemmt die Produktionsmöglichkeit im Winterhalbjahr schwerstens.

Die Länge des Bergwinters wirkt sich auch darin aus, daß die Bäume gut einen Monat später austreiben als im Tal herunten. Am 28. Mai waren die Winterknospen auf dem Patscherkofel noch geschlossen, am 13. Juni zu grünen Pinseln geworden, nicht größer als sie im Botanischen Garten 5 Wochen früher waren. Um ebensoviel verspätet sich daher die durch den Trieb bedingte, oben erläuterte Frühjahrsdepression.

Die *Schattennadeln* der Bergfichte (Abb. 7) sind genau so wie bei den Bäumen im Tal wintersüber aktiver als die aus der Sonne — vergleichsweise schwach negatives Assimilationsvermögen beschränkt sich auf Februar—März — und erholen sich wie bei diesen im Frühjahr rascher. Das hängt auch hier zweifellos mit dem Chorophyllschwund der Sonnennadeln zusammen, der in der Höhe größer sein dürfte als in Tieflagen. Jedenfalls wird die Verfärbung um so auffälliger, je höher man steigt, um so deutlicher auch auf die Südseite der Bäume begrenzt. Das ist nicht nur in der Umgebung von Innsbruck so, wo aus dieser Richtung der Föhn stürmt, sondern bei Obergurgl z. B. auch auf solchen Rücken, wo der Wind im Winter weitaus am häufigsten und stärksten aus Nord weht. Als Ursache des Chlorophyllabbaues dürfte demnach die Sonnenstrahlung anzusprechen sein. Die Nadelbäume, schon im Sommer auf der Sonnenseite ihrer Kronen besonders in der Höhe nicht so satt grün wie auf der Gegenseite, werden vermutlich im Winter gegen die Sonnen-

strahlung empfindlicher[1], so daß es zu teilweisem Abbau des Chlorophylls kommt. Aus der warmen Jahreszeit ist solcher Chlorophyllschwund durch MONTFORT (1950, 1953) von manchen anderen „photolabilen" Pflanzen bekannt. Wahrscheinlich handelt es sich um oxydative Zerstörung durch „Photoperoxyde" (HAGER 1957). Daß sich im Winter im Protoplasma des Assimilationsparenchyms der Coniferen an der Waldgrenze noch andere Veränderungen bemerkbar machen, sei unter Hinweis auf die gründliche, einschlägige Studie von HOLZER (1958) nur angedeutet. Derlei Studien mögen die winterliche Depression des

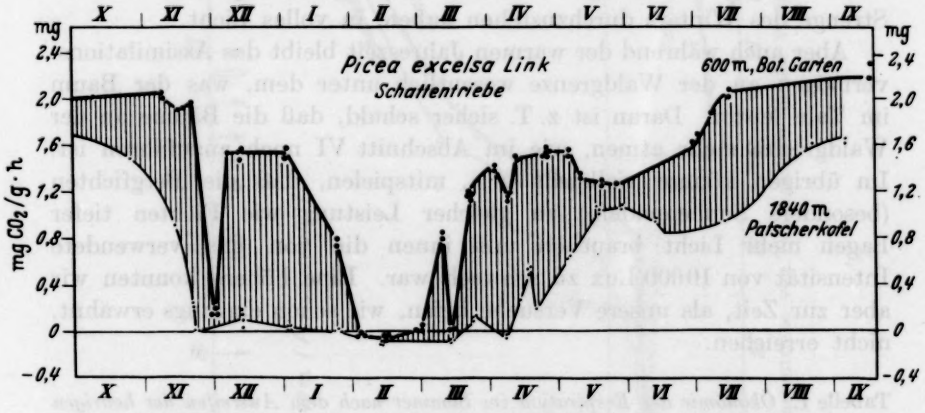


Abb. 7. Vergleich zwischen dem Assimilationsvermögen (mg CO_2/g Trockengewicht und Stunde, 12° C, 10000 Lux) der Schattentriebe von *Picea excelsa* im Botanischen Garten und jenem der Schattentriebe des Baumes auf dem Patscherkofel

Assimilationsvermögens aufhellen helfen, die als solche — entgegen der Meinung von IWANOW und ORLOWA — nichts mit dem Chlorophyllschwund zu tun hat. Sie ist ja, wie wir gesehen haben, auch bei den Schattennadeln vorhanden. Nur erholen sich diese mit ihrem leidlich intakt bleibenden Blattgrün im winterlichen Wärmungsversuch wie auch im Frühjahr am Standort besser und rascher als ihre Schwestern an der Südseite der Krone.

Bei Warmhaltung erholen sich im übrigen Sonnen- *und* Schattennadeln des Waldgrenzbaumes zu allen Terminen langsamer und weniger weit als jene des Baumes im Botanischen Garten (Abb. 5). Wie man erwarten muß, reagieren die Sonnennadeln des Baumes an der Waldgrenze im Februar absolut am trägsten; sie kompensieren erst, nachdem sie drei volle Tage in der Wärme waren, und arbeiten noch am Ende des vierten Tages nur ganz schwach positiv.

[1] Wofür u. a. auch spricht, daß Nadeln unmittelbar über der Schneeoberfläche am stärksten ausbleichen, also dort, wo infolge der großen Albedo die Strahlung am intensivsten ist (TRANQUILLINI 1957).

Der Unterschied zwischen dem Assimilationsvermögen von Sonnen- und Schattennadeln (gemessen an der Größe der Fläche, die die Kurven mit der Abszisse einschließen) ist nach unseren Testerfahrungen an der Waldgrenze gleich wie in Tieflagen. Hier wie dort sind die Schattennadeln im Durchschnitt 1,2× überlegen. Das Vermögen in der Hochlage erreicht im Jahresdurchschnitt nur 48%, d. i. weniger als die Hälfte des Betrages im Tal. Im Winter ist das Verhältnis noch viel ungünstiger. Abb. 6 und 7 rücken von der Seite der Assimilationsökologie her die Schwere des Existenzkampfes, den Baum und Wald an ihrer oberen Verbreitungsgrenze infolge der Kürze der Vegetationsperiode und der Strenge des Winters durchzustehen haben, in volles Licht.

Aber auch während der warmen Jahreszeit bleibt das Assimilationsvermögen an der Waldgrenze wesentlich unter dem, was der Baum im Tale leistet. Daran ist z. T. sicher schuld, daß die Bäume an der Waldgrenze mehr atmen, wie im Abschnitt VI noch anzuführen ist. Im übrigen könnte vielleicht u. a. mitspielen, daß die Bergfichten (besonders Sonnennadeln) zu gleicher Leistung wie Fichten tiefer Lagen mehr Licht brauchen und ihnen die von uns verwendete Intensität von 10000 Lux zu schwach war. Eine höhere konnten wir aber zur Zeit, als unsere Versuche liefen, wie schon eingangs erwähnt, nicht erreichen.

Tabelle 1. *Ökonomie der Respiration im Sommer nach dem Ausreifen der heurigen Nadeln.* (Mittelwerte)

	Netto-Assimilation	Respiration	Netto-Assimilation + Resp./Resp.
	mg CO_2/g Trockengewicht × h bei 12° C und 10 000 Lux		bei 12° C und 10 000 Lux
Picea excelsa, Tallage			
Sonnentriebe	2,00	0,24	9,3
Schattentriebe	2,17	0,23	10,4
Picea excelsa, Waldgrenze			
Sonnentriebe	1,55	0,37	5,2
Schattentriebe	1,65	0,36	5,6
Pinus cembra, Waldgrenze			
Sonnentriebe	1,72	0,30	6,7
Schattentriebe	1,82	0,29	7,3

Unter unseren Versuchsverhältnissen binden die Fichten in Tallage nach der Nadelreife im Sommer bis Herbst je Trockengewichtseinheit und Stunde 9 bis 10mal mehr CO_2 als sie gleichzeitig durch Atmung freisetzen, an der Waldgrenze nur das 5,2- bis 5,6-fache (Tab. 1, 3. Kolonne). Die Zirben der Waldgrenze schneiden etwas besser ab.

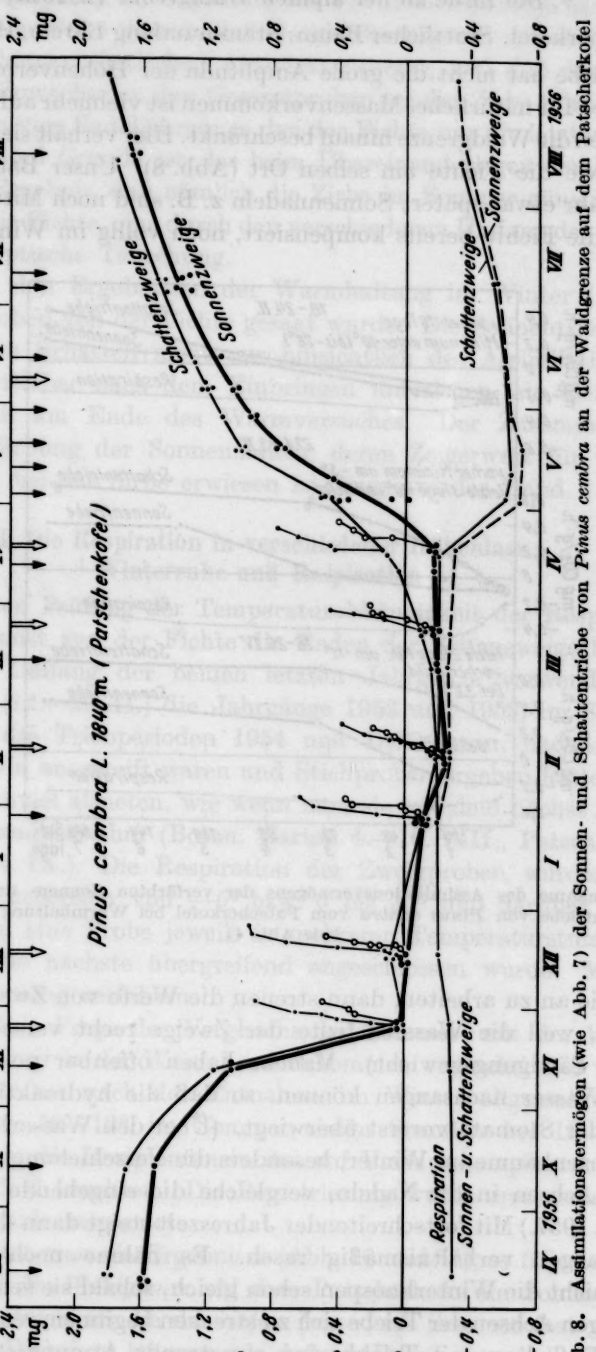


Abb. 8. Assimilationsvermögen (wie Abb. 7) der Sonnen- und Schattentriebe von *Pinus cembra* an der Waldgrenze auf dem Patscherkofel

V. Die Zirbe an der alpinen Waldgrenze (1840 m)

Patscherkofel. Stattlicher Baum, Stammumfang 130 cm, Höhe 8 m

Die Zirbe hat nicht die große Amplitude der Höhenverbreitung wie die Fichte. Ihr natürliches Massenvorkommen ist vielmehr auf die Höhenlagen gegen die Waldgrenze hinauf beschränkt. Hier verhält sie sich grundsätzlich wie die Fichte am selben Ort (Abb. 8). Unser Baum erwacht im Frühjahr etwas später; Sonnennadeln z. B. sind noch Mitte April zur Zeit, als die Fichte bereits kompensiert, noch völlig im Winterzustand.

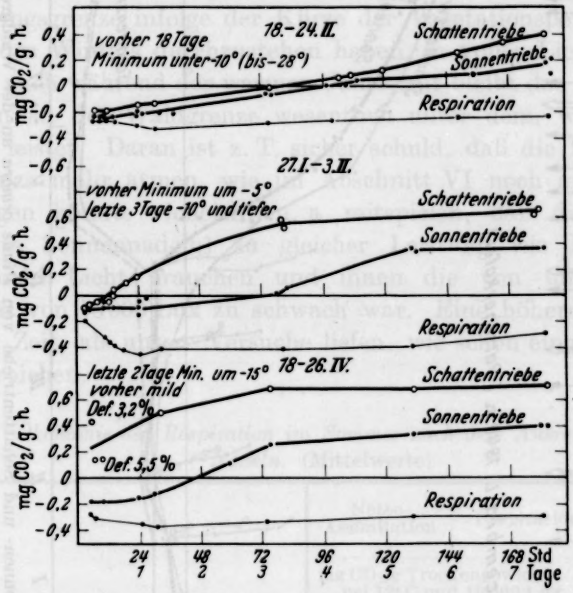


Abb. 9. Zunahme des Assimilationsvermögens der verfärbten Sonnen- und der grünen Schattentriebe von *Pinus cembra* vom Patscherkofel bei Warmhaltung im Winter (wie Abb. 4)

Fangen sie an zu arbeiten, dann streuen die Werte von Zweig zu Zweig oft stark, weil die Wasserdefizite der Zweige recht verschieden sind (4—10% Sättigungsgewicht). Manche haben offenbar noch nicht genügend Wasser nachsaugen können, so daß die hydroaktive Schließtendenz der Stomata vorerst überwiegt. (Über den Wasserhaushalt der Waldgrenzenbäume im Winter, besonders die Verschiebung des Wassers von den Achsen in die Nadeln, vergleiche die eingehende Studie von LARCHER 1957.) Mit fortschreitender Jahreszeit steigt dann das Assimilationsvermögen verhältnismäßig rasch. Es nähme noch steiler zu, würden nicht die Winterknospen schon gleich, sobald sie schwellen, und die heurigen Achsen der Triebe sich zu strecken beginnen, recht energisch atmen. Daß diese mit Triebbeginn einsetzende Atmungssteigerung in

der Netto-Assimilation im Gegensatz zur Fichte sich nicht schärfer abzeichnet, ist die Folge dessen, daß sie gleichzeitig mit der steilen Zunahme der photosynthetischen Aktivität einsetzt, und daß der Anteil der heurigen Zuwächse an den Gesamtproben bei der Zirbe relativ klein ist (die letzten vier Nadeljahrgänge, bei der Fichte nur die letzten zwei). Aus dem zweiten Grunde ist das beim Übereinanderlegen der Kurven abzulesende Ergebnis, daß nämlich die Zirbe im Sommer günstiger abschneide als die Fichte, eine durch den verschiedenen Umfang der Proben verursachte optische Täuschung.

Auch von den Ergebnissen der Warmhaltung im Winter (Abb. 9) gilt das, was oben von der Fichte gesagt wurde. Die Sonnentriebe sind jenen aus dem Schatten nicht nur hinsichtlich des Assimilationsvermögens unmittelbar nach dem Einbringen unterlegen, sie bleiben es vielmehr auch am Ende des Warmversuches. Der Zusammenhang mit der Mißfärbung der Sonnennadeln, deren Zeigerwert für Chlorophyllschwund bei der Zirbe erwiesen ist, liegt auf der Hand.

VI. Die Respiration in verschiedener Höhenlage. Winterruhe und Respiration

Zur genauen Prüfung der Temperaturabhängigkeit der Respiration wurden wie sonst von der Fichte die Enden der Seitenzweige höherer Ordnung im Umfang der beiden letzten Jahrgänge verwendet; im Winter 1954 (12.—25. II.) die Jahrgänge 1952 und 1953, im Sommer 1955 kamen die Triebperioden 1954 und 1955 daran, nachdem die heurigen Nadeln ausgereift waren und Stichproben ergeben hatten, daß sie allein gleichviel atmeten, wie wenn man sie mit dem nächst älteren Jahrgang zusammennahm (Botan. Garten 4.—16. VIII., Patscherkofel 15. VIII. bis 4. IX.). Die Respiration der Zweigproben wurden über den Temperaturbereich von —5° bzw. 0 bis 30° und darüber hinaus geprüft, indem eine Probe jeweils in mehreren Temperaturstufen verwendet und die nächste übergreifend angeschlossen wurde. Mit der Zirbe wurde analog verfahren.

An die heikle Frage des Vergleichs der Sommer- mit der Winteratmung haben wir in der Weise heranzukommen versucht, daß wir die Proben unmittelbar nach der Entnahme im Winter allgemein zuerst etwa 8 Std bei 10—12°, im Sommer einige Stunden bei 15—18° C hielten, dann in die Rezipienten in das auf Versuchstemperatur eingestellte Wasserbad brachten. Die Registrierung wurde erst nach nochmals einer Stunde verwertet.

1. Betrachtet man die Ergebnisse (Abb. 10 und 11), so fällt auf, daß die *Fichten an der Waldgrenze* auf dem Patscherkofel im Sommer *und* Winter mehr atmen als die der *tiefen Lagen*; im Sommer fast um die Hälfte mehr. Wobei zu betonen ist, daß als Repräsentant der Tallage

hier nicht bloß die Gartenfichte figuriert, die allerdings am eingehendsten untersucht ist. Die Werte zweier anderer, in tiefen Lagen ausgesuchter Versuchsstücke (eines am Ausgang der Sillschlucht 580 m, das andere bei Igls 900 m) ordnen sich mit jenen der Gartenfichte völlig in

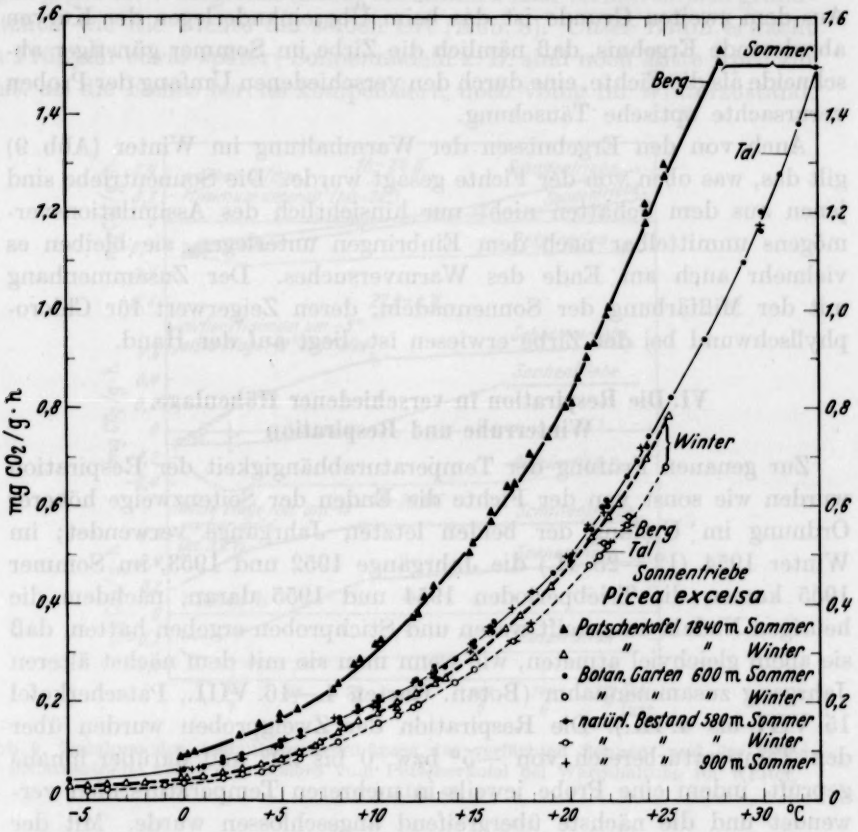


Abb. 10. *Respiration* (mg CO_2/g Trockengewicht und Stunde) von Sonnentrieben (letzte zwei Jahrgänge) der *Picea excelsa* im Botanischen Garten, 600 m, und an der Waldgrenze, 1840 m, in Abhängigkeit von der Temperatur. 1. im Sommer: August (600 m) bis Anfang September (1840 m); 2. im Februar. In beiden Höhenlagen atmet die Fichte im Sommer mehr als im Winter; sie atmet an der Waldgrenze jedesmal mehr als im Tal

dieselbe Kurve. Andererseits stammen die Proben von der Waldgrenze auf dem Patscherkofel auch nicht von einem Einzelbaum, sondern von einer für die dortige Waldgrenze charakteristischen Gruppe von Pionierbäumen. Schließlich ist zu sagen, daß die Respirationsintensität von Fichten aus der Gegend der Birgitzalm (1600 m) und der Mutterer Alm (1650 m), die der Übersichtlichkeit wegen in der Abbildung weggelassen wurden, die Mitte zwischen den beiden Gruppen der Bäume im Tal und an der Waldgrenze einnehmen. Wir halten daher das Ergebnis,

daß die Respirationsintensität in der Höhe, besonders an der Waldgrenze, höher ist als in Tieflagen, nicht für zufällig, sondern für typisch und sehen darin — ohne vorläufig auf die möglichen Ursachen einzugehen — einen wesentlichen Punkt für die Beurteilung des Komplexproblems der alpinen Waldgrenze.

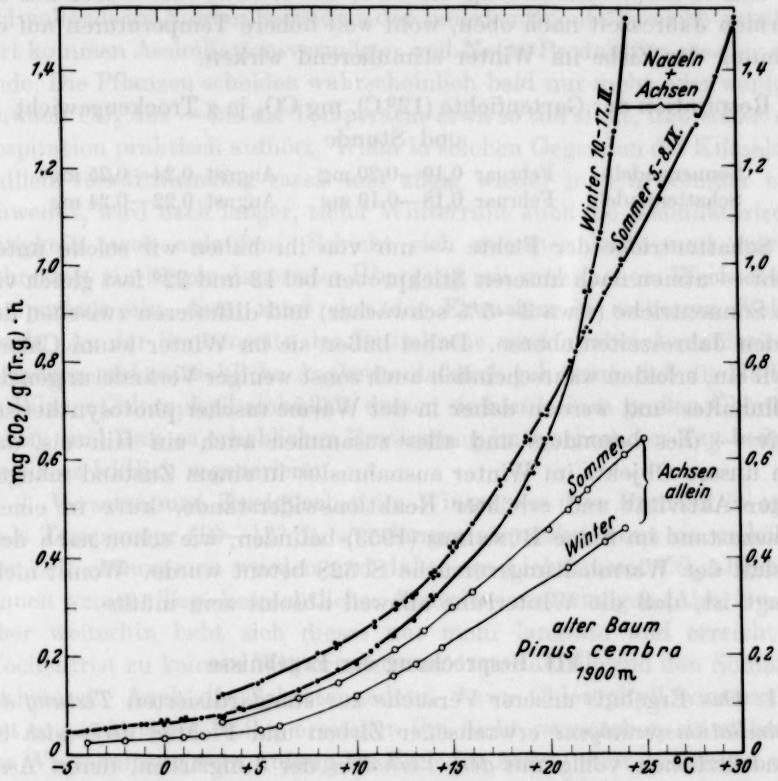


Abb. 11. Sommer- und Winterrespiration (mg CO_2/g Trockengewicht und Stunde) von Sonnentrieben der *Pinus cembra* an der Waldgrenze 1840 m in Abhängigkeit von der Temperatur

Nackte Triebstücke älteren Jahrgangs, welche die Nadeln bereits verloren hatten (in exponierten Lagen an der Waldgrenze halten die Nadeln kaum länger als drei Jahre aus), zeigen bei Fichte und Zirbe grundsätzlich dieselbe Abhängigkeit der Respirationsintensität von der Höhenlage, nur ist der Unterschied bei diesen im Winter größer als im Sommer.

2. Die Proben von Fichten *im Tal wie auf der Höhe* atmen im Februar über den ganzen geprüften Temperaturbereich schwächer als im August. Besonders auffällig ist der *Unterschied zwischen Winter- und Sommeratmung* bei 0^0 bis etwa 5^0. Bei diesen niederen Temperaturen atmen die Sonnentriebe der Bergfichten im Winter kaum halb soviel wie im Sommer, die Talfichten fast halb soviel. Auch hinsichtlich der

jahreszeitlichen Respirationsunterschiede verhalten sich die nackten Achsen grundsätzlich wie die benadelten Triebe.

Nicht anders ist es bei den *Zirben* der Waldgrenze. Auch sie atmen im Winter besonders bei niederen Temperaturen bedeutend weniger, als sie bei gleicher Temperatur im Sommer respirieren. Doch überschneidet die Kurve der Winteratmung der Zirbe bei etwa 20° die Kurve aus der warmen Jahreszeit nach oben, wohl weil höhere Temperaturen auf die Atmung der Zirbe im Winter stimulierend wirken.

Respiration der Gartenfichte (12° C), mg CO_2 je g Trockengewicht und Stunde

Sonnennadeln	Februar	0,19—0,20 mg	August	0,24—0,25 mg
Schattennadeln	Februar	0,18—0,19 mg	August	0,22—0,24 mg

Schattentriebe der Fichte — nur von ihr haben wir solche untersucht — atmen nach unseren Stichproben bei 12 und 22° fast gleich viel wie Sonnentriebe (etwa 3—5% schwächer) und differieren zwischen den beiden Jahreszeiten ebenso. Dabei büßen sie im Winter kaum Chlorophyll ein, erleiden wahrscheinlich auch sonst weniger Veränderungen des Zellinhaltes und werden daher in der Wärme rascher photosynthetisch aktiv — dies besonders und alles zusammen auch ein Hinweis, daß sich unsere Objekte im Winter ausnahmslos in einem Zustand mangelhafter Aktivität und erhöhter Reaktionswiderstände, kurz in einem Ruhezustand im Sinne Bünnings (1953) befinden, wie schon nach dem Ausfall der Warmhaltungsversuche S. 528 betont wurde. Womit nicht gesagt ist, daß die Winterruhe alleweil absolut sein müßte.

VII. Besprechung der Ergebnisse

1. Das Ergebnis unserer Versuche zur standardisierten *Testung des Assimilationsvermögens* erwachsener Zirben und Fichten *deckt sich* im grundsätzlichen völlig mit *dem Verhalten* der Jungzirben, deren Assimilation Tranquillini *am Standort* an der Waldgrenze registriert und studiert hat. Nehmen wir hinzu, daß Iwanow und Orlowa (1931) bei *Pinus silvestris* beiläufig dasselbe herausbrachten, so kommen wir zu einer allgemeiner gültigen Vorstellung über das Verhalten der alpin-nordischen immergrünen Coniferen.

2. Wo die Übergangszeit vom Sommer zum Winter lang ist und in der Regel Kalt- und Warmwetterperioden wiederholt einander ablösen (wie in den Niederungen Mitteleuropas), wobei die Temperatur häufig in dem für das Assimilationsvermögen besonders wichtigen Bereich zwischen wenigen Graden über und unter Null auf und ab schwankt, hängt es ganz von der Häufigkeit und Tiefe des Frostes ab, wie lange und in welchem Maße diese Jahreszeit für den Stoffgewinn genützt werden kann. Kräftige spätherbstliche Kälteeinbrüche bringen das Assimilations-

vermögen unter Testbedingungen wie auch die Netto-Produktion am Standort völlig zum Stillstand, sei es unmittelbar durch reversible Lähmung des Photosyntheseapparates, sei es mittelbar über hydroaktiven Spaltenschluß infolge Einfrierens des Wassers im Boden und in den Achsenteilen der Pflanzen. Wo der Übergang kurz und der Beginn des Winters unwiderruflich ist, wie das in gewissem Grade im Hochgebirge und vollends im Norden besonders der Innerkontinentalbereiche zutrifft, dort kommen Assimilationsvermögen und Netto-Produktion rascher ans Ende. Die Pflanzen scheiden wahrscheinlich bald nur mehr oder weniger schwach CO_2 aus — bis die Temperatur etwa so tief sinkt, daß selbst die Respiration praktisch aufhört. Wenn in solchen Gegenden die Klimalage endlich verhältnismäßig rasch und zügig wieder in den Sommer umschwenkt, wird nach langer, tiefer Winterruhe auch die assimilatorische Tätigkeit rasch anlaufen. Schiebt sich zwischen kalte und warme Jahreszeit ein länger dauernder Übergang mit mehrfachem Wechsel der Temperatur ein, dann setzt sich das Erwachen in mehreren Wellen durch. An der Sonnenseite der Baumkrone wird hierbei Assimilationsvermögen und tatsächliche Ausbeute dadurch gehemmt, daß die Nadeln im Winter Chlorophyll einbüßen, dessen sie hier keinen großen Überfluß haben, und daß es erheblicher Erwärmung im wachsenden Tag bedarf, bis sie es leidlich regenerieren.

3. Versetzt man Zweigproben im Winter aus dem Freiland in optimale Temperatur (10—12° C), so erlangen sie, selbst wenn sie zu kältester Zeit entnommen wurden und daher am Licht zuerst CO_2 abgeben, binnen weniger Tage beträchtliches Assimilationsvermögen (Abb. 3 u. 5). Aber weiterhin hebt sich dieses nur mehr langsam und erreicht in Wochenfrist zu keinem Wintertermin auch nur annähernd den Sommerhochstand. Auch die Schattennadeln, deren Chlorophyll wintersüber fast ungeschmälert bleibt, erreichen ihn nicht, wennschon sie während der Warmhaltung vom Anfang bis Ende im Assimilationsvermögen voraus sind. Die Winterruhe läßt sich also, wenn einmal induziert, nicht so rasch durch Wärme löschen und lange nicht vollständig aufheben. Das puffert die Pflanze gegen starke Temperaturschwankungen. Mit dem Chlorophyllabbau hat dies nichts zu tun. Die Winterruhe ist zum Teil durchaus echt, wofür vor allem spricht, daß die Aktivität gemessen an der Intensität der Respiration (bei gleicher Temperatur) im Verhältnis zum Sommer herabgesetzt ist. Daß sie bei tiefen Temperaturen besonders auffällig niedrig ist, kommt nebenbei dem Stoffhaushalt im produktionsleeren Winter zugute. Im übrigen ergaben sich ebenso wie beim Studium der Frosthärte Anzeichen dafür, daß sich die Pflanzen nicht rein nur unter dem brutalen Zwang des Klimawechsels zum Winter (Sommer) umstellen, sondern schon von sich aus einen Ruhezustand (Aktivität) anstreben.

4. Der Vergleich zwischen dem Assimilationsvermögen von Fichten an der Waldgrenze und im Tal (Abb. 6 u. 7) beleuchtet die kritische Lage des Baumes an der Waldgrenze. Die frostfreie Sommerzeit ist hier viel kürzer, der Frost in der Regel tiefer als in der Niederung, wogegen die mitunter höheren Tagesmaxima nichts ausrichten (Tabelle 2, Abb. 6 und 12). Das Assimilationsvermögen — und die tatsächliche CO_2-Ausbeute (TRANQUILLINI 1957!) — waren bei den Sonnennadeln im

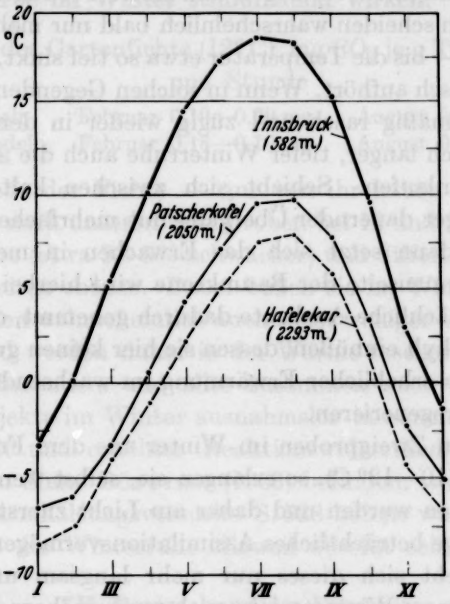


Abb. 12. Monatsmittel der Temperatur Innsbruck-Stadt (582 m), Patscherkofel (2050 m, unmittelbar südlich) und Hafelekar (2293 m, unmittelbar nördlich von Innsbruck) 1941 bis 1950. Aus WINKLER 1957

langen Bergwinter 1955/56 (Ende November bis Anfang Mai!) praktisch Null; bei den Schattennadeln minimal. Hier liegt zweifellos der allgemeine Kern des Waldgrenzenproblems, so viel andere Faktoren mit fallweise wechselndem Gewicht hierbei außerdem noch mitreden. Die Langsamkeit des Wachstums, die Geringfügigkeit des Längen- und Dickenzuwachses findet hier mindest zum Teil ihre Erklärung. Wozu noch kommt, daß das Assimilationsvermögen an der Waldgrenze auch im Sommer geringer ist als tiefer unten. Zum Teil ist daran die relativ intensive Respiration der Bergpflanzen schuld. Aber dieses Minus an Assimilationsvermögen im Sommer besagt wenig über die tatsächliche CO_2-Ausbeute zu dieser Jahreszeit. Sicher ist die tatsächliche Sommerbilanz an der Waldgrenze besser als das Assimilationsvermögen erwarten läßt. Der Stoffverlust durch Respiration muß hier nämlich bedeutend

Tabelle 2

	Innsbruck 582 m		Waldgrenze Patscherkofel 1909 m 1955	Innsbruck Stadt 582 m 1956	Waldgrenze Patscherkofel 1909 m 1956
	Mittel (Max.) 1906/30	1955			
Eistage	25,8 (52)	20	88	44	107
Frosttage	114,3 (147)	122	210	132	209
Tage mit Mittel über 0° C	—	303	218	283	199

geringer veranschlagt werden als in Tieflagen, weil die Schatten- und Nachttemperaturen viel niedriger sind. Gehen sie doch im Sommer im groben Durchschnitt je 200 m Höhenzunahme bekanntlich um 1,3° zurück. Das macht für die Gesamtphotosynthese wenig, für die Respiration viel aus. Auch mag der Lichtgenuß der Berghöhen die Bilanz günstiger gestalten. Hier ist noch viel eingehende Sommerarbeit am Standort nötig.

5. Das Ergebnis über die Änderungen des Assimilationsvermögens mit dem Temperaturklima, zusammengenommen mit den standörtlichen Erfahrungen, erlaubt ohne weiteres gewisse Voraussagen über die Assimilationserwartung in langen und kurzen, in strengen und milden Wintern, etwa an Hand von Angaben über die Zahl und Verteilung der Frosttage, die Tiefe des Frostes und die Zahl der Eistage (vgl. WINKLER 1957). Während anhaltend frostfreies Wetter im allgemeinen — nicht aber vereinzelte solche Tage im Winter! — für die Assimilation gut bis bestens genützt werden kann, beeinträchtigt Nachtfrost, sobald er unter —4° herabgeht, die photosynthetische Leistung am folgenden Tag im Spätherbst empfindlich, besonders wenn er sich unmittelbar aufeinanderfolgend wiederholt. Im Vorfrühling verzögert er das Wiederaufleben der Aktivität. Wenige Eistage mit Minimum von nur —6 bis —8° C hintereinander reichen aus, daß das Assimilationsvermögen nahezu Null und die tatsächliche Netto-Assimilation am Standort negativ wird.

Zusammenfassung

Angefangen vom Zeitpunkt, da die Nadeln des heurigen Zuwachses ausgereift sind, bleibt das Assimilationsvermögen (mg CO_2/g Trockengewicht und Stunde; 12° C, 10000 Lux) der untersuchten Koniferen den Sommer hindurch bis weit in den Herbst hinein sehr konstant, solange es keinen Frost gibt. Fängt im beginnenden Winter die Temperatur an, zwischen wenigen Graden über und unter dem Gefrierpunkt zu pendeln, dann schwankt das Assimilationsvermögen mit der Temperatur stark auf und ab. Die Nadeln hören nämlich auf, C am Licht im Überschuß zu binden, wenn die Temperatur einige wenige Grade unter den Nullpunkt sinkt (äußerstens bei —4 bis —5°). Solch schwacher Frost aber

hemmt die Photosynthese nicht nur während der Dauer seiner Einwirkung; er drückt sie, wenn er im beginnenden Winter als unmittelbar hintereinander sich wiederholender Nachtfrost einfällt, am Tage nachwirkend immer mehr auch dann, wenn die Temperatur während der hellen Stunden über Null steigt (Tranquillini 1957). Nur wenig stärkerer Frost von -6^0 bis -8^0 läßt das Assimilationsvermögen im Testversuch auf Null und darunter sinken. Dann bedarf es länger dauernden, milden Winterwetters, bis die Pflanzen sich wieder einigermaßen erholen. Völlig erholen sie sich erst mit durchgreifender Erwärmung im beginnenden Frühjahr. Das gilt besonders von den besonnten Kronenteilen, deren Chlorophyll im Winter z. T. zerstört wird. Vorübergehende Temperaturrückschläge verursachen auch im Frühjahr entsprechende Schwankungen des Assimilationsvermögens und der C-Ausbeute.

So können auch die immergrünen, nordisch-alpinen Coniferen aus dem Dauerbesitz ihrer Assimilationsorgane nur solange (bzw. nur dort) ausgiebigeren Vorteil ziehen, als (wo) der Winter keine längeren, geschweige scharfen Frostperioden bringt. An der Waldgrenze hält die — im Gegensatz zur Niederung — im allgemeinen große Zahl und die Kontinuität der Frosttage die Photosynthese 4—5 Monate lang ständig so niedrig, daß bestenfalls das durch die gleichzeitige Atmung erzeugte CO_2 reassimiliert wird. Solange bleibt die Gesamt-C-Bilanz der Pflanze negativ — eine Tatsache, die bei der Erklärung der Waldgrenze entscheidend mitspricht. Dabei ist weiter zu berücksichtigen, daß die Dunkelrespiration (je Trockengewichtseinheit, Fichte) im Sommer *und* Winter an der Waldgrenze größer ist als in Tieflagen. Daß die Zweige anderseits hier wie dort im Hochwinter, besonders bei Temperaturen gegen 0^0 (in größerer Kälte nicht untersucht), wesentlich schwächer atmen als bei gleicher Temperatur im Sommer, spricht neben anderen Erfahrungen klar dafür, daß sich die Bäume zu dieser Zeit in einem gewissen Ruhezustand befinden.

Literatur

Ålvik, G.: Über Assimilation und Atmung einiger Holzgewächse im westnorwegischen Winter. Medd. Vestl. Forstl. Forsöksstat. **22**, 1 (1939). — Bünning, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Berlin-Göttingen-Heidelberg. Springer 1953. — Clark, J.: Photosynthesis of white spruce and balsam fir. Bi-m. Progr. Ref. Dir. For. Biol. Dep. Agric. Can. **12**, 5 (1956). — Hager, A.: Über den Einfluß klimatischer Faktoren auf den Blattfarbstoffgehalt höherer Pflanzen. Planta (Berl.) **49**, 524 (1957). — Holzer, K.: Die winterlichen Veränderungen der Assimilationszellen von Zirbe (Pinus cembra L.) und Fichte (Picea excelsa Link) an der alpinen Waldgrenze. Öst. bot. Z. **104** (1957). — Iwanow, L. A., u. I. M. Orlowa: Zur Frage über die Winterassimilation von Kohlensäure unserer Nadelhölzer. Z. russ. bot. Ges. **16**, 139 (1931). [Russisch]. — Larcher, W.: Frosttrocknis an der alpinen Waldgrenze und in der Zwergstrauchheide auf dem Patscherkofel. Veröffentl. Museum Ferdinandeum

Innsbr. 1957. — Montfort, C.: Photochemische Wirkungen des Höhenklimas auf die Chloroplasten photolabiler Pflanzen im Mittel- und Hochgebirge. Z. Naturforsch. **5b**, 221 (1950). — Hochsommerliche Veränderungen des Chlorophyllspiegels bei Laubblättern von gegensätzlichem photochemischen Reaktionstypus. Planta (Berl.) **42**, 461 (1953). — Pisek, A.: Zur Kenntnis der Frosthärte alpiner Pflanzen. Naturwissenschaften **39**, 73 (1952). — Pisek, A., u. G. Rehner: Temperaturminima der Netto-Assimilation von mediterranen und nordisch-alpinen Immergrünen. Ber. Dtsch. bot. Ges. **70** (1958). — Pisek, A., u. R. Schiessl: Die Temperaturbeeinflußbarkeit der Frosthärte von Nadelhölzern und Zwergsträuchern der alpinen Waldgrenze. Ber. naturwiss.-med. Verein Innsbruck **47**, 33 (1947). — Pisek, A., u. W. Tranquillini: Assimilation und Kohlenstoffhaushalt in der Krone von Fichten- (Picea excelsa Link) und Rotbuchenbäumen (Fagus silvatica L.). Flora (Jena) **141**, 237 (1954). — Pisek, A., u. E. Winkler: Wassersättigungsdefizit, Spaltenbewegung und Photosynthese. Protoplasma (Wien) **46**, 597 (1956). — Tranquillini, W.: Der Ultrarot-Absorptionsschreiber im Dienste ökologischer Messungen des pflanzlichen CO_2-Umsatzes. Ber. dtsch. bot. Ges. **65**, 102 (1952). — Die Bedeutung des Lichtes und der Temperatur für die Kohlensäureassimilation von Pinus Cembra-Jungwuchs an einem alpinen Standort. Planta (Berl.) **46**, 154 (1955/56). — Standortsklima, Wasserbilanz und CO_2-Gaswechsel junger Zirben (Pinus Cembra L.) an der alpinen Waldgrenze. Planta (Berl.) **49**, 612 (1957). — Tranquillini, W., u. K. Holzer: Über das Gefrieren und Auftauen von Coniferennadeln. Ber. dtsch. bot. Ges. **70** (1958). — Winkler, E.: Klimaelemente für Innsbruck (582 m) und Patscherkofel (1909 m) im Zusammenhang mit der Assimilation von Fichten in verschiedenen Höhenlagen. Veröffentl. Museum Ferdinandeum Innsbruck 1957. Zeller, O.: Über Assimilation und Atmung der Pflanzen im Winter bei tiefen Temperaturen. Planta (Berl.) **39**, 500 (1951).

Prof. Dr. A. Pisek,
Innsbruck (Österreich), Botanisches Institut der Universität, Sternwartestr. 15

Planta, Bd. 51, S. 544—546 (1958)

Kurze Mitteilung

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

ZUR FRAGE EINER AEROBEN GÄRUNG IN WURZELMERISTEMEN

Bemerkung zur Arbeit von A. Betz: Planta 50, 122 (1957)

Von

Otto Kandler

(Eingegangen am 31. Januar 1958)

Kürzlich hat Betz (1957) auf einen „Widerspruch" zwischen den Befunden Kandlers von 1950 und 1953 hingewiesen und zu deren „Aufklärung" einige eigene Befunde mitgeteilt. Dem Kritiker ist es jedoch offensichtlich entgangen, daß sich zwischen den Daten der beiden erwähnten Arbeiten keinerlei Widerspruch ergibt, wenn man die völlig unterschiedliche Versuchsbedingung berücksichtigt.

Im 1. Fall (Kandler 1950) wurde der Gasstoffwechsel von isolierten Maiswurzelspitzen in Nährlösung nur in einem 4 h-Intervall unmittelbar nach der Isolierung und dem Ersatz der normalen Luft durch reinen O_2 gemessen. Dabei ergab sich ein Abfall des RQ-Wertes von dem in Luft gemessenen Wert von 1,3 auf 0,8. Daraus wurde damals der Schluß gezogen, daß die von Ruhland und Ramshorn (1938) gefundene alkoholische Gärung der Wurzelmeristeme nicht im strengen Sinne aerob (also obligat), sondern nur durch Sauerstoffmangel hervorgerufen ist. In der neuen Arbeit von Betz wird für Erbsenwurzeln der ganz entsprechende Abfall des RQ nach O_2-Zugabe gezeigt. Es wird auch darauf hingewiesen, daß bei Maiswurzeln dieser niedere Wert 1—2 h länger beibehalten wird als bei den von Betz ausführlicher untersuchten Erbsenwurzeln. Damit ergibt sich eine vollständige Bestätigung der Kandlerschen Befunde von 1950.

Im 2. Fall (Kandler 1953) wurden Maiswurzelspitzen $4^1/_2$ Tage in Nährlösung unter reinem O_2 kultiviert, wobei sich das Trockengewicht vervierfachte. Neben 7,7 mg Glucose, die zu CO_2 veratmet wurden, sind im gleichen Zeitraum 0,2 mg N aus Nitrat zur Ammoniak-Stufe reduziert worden. Von der assimilierten Glucose dürfte der größte Teil in Form von Polysacchariden, ein geringer Teil in Form von Protein, Nucleotiden, Fetten, org. Säuren usw. vorliegen. In bezug auf den RQ sind die Polysaccharide uninteressant, die Synthese der anderen Verbindungen führt aber wegen deren stärker reduzierten Form zur Bildung von „Extra O_2", und nur die org. Säuren, die aber in jungen Wurzeln

mengenmäßig kaum ins Gewicht fallen, bedingen einen Verbrauch an „Extra O_2".

Gegenüber der großen Menge an „Extra O_2", die durch die Nitratreduktion entsteht, dürften die eben erwähnten Stoffumsetzungen zu vernachlässigen sein. Berechnet man den zu erwartenden RQ aus den Daten der Tabelle 4 (KANDLER 1953), so ergibt sich, wie die Gleichung 1 zeigt, ein RQ von 1,12.

$$\left.\begin{array}{c} 43\,\mu M\ \text{Glucose} \rightarrow -258\,\mu M\ O_2 + 258\,\mu M\ CO_2 \\ 14\,\mu M\ NO_3^- \rightarrow 14\,\mu M\ (NH_2) + 28\,\mu M\ O_2 \\ \hline 43\,\mu M\ \text{Glucose} + 14\,\mu M\ NO_3 \rightarrow 14\,\mu M\ (NH_2) - 230\,\mu M\ O_2 + 258\,\mu M\ CO_2 \\ RQ = 1{,}12 \end{array}\right\} (1)$$

Tatsächlich war ein RQ von 1,1 gefunden worden. Wenn sich die Pflanze von Glucose und Nitrat ernährt, so muß, auch wenn keinerlei alkoholische Gärung abläuft, immer ein RQ über 1,0 resultieren, da der bei der Nitratreduktion entstehende O_2 als Wasserstoffacceptor Luftsauerstoff ersetzt. Das gleiche gilt für die anderen, quantitativ weniger entscheidenden Reduktionsprozesse. In Sonderfällen, wo ungewöhnliche Mengen organischer Säuren gebildet werden, vielleicht bei Succulentengewebe, könnte natürlich eine gewisse Kompensation dieser RQ-Erhöhung eintreten.

Der Unterschied in den Werten von 1950 (0,8) und 1953 (1,1) erklärt sich einfach daraus, daß in den 4 h des ersten Versuches nur ein sehr geringes Wachstum erfolgte und vermutlich die während des langen vorangegangenen Aufenthaltes in der Luft aufgestauten Gärungsprodukte veratmet wurden. Daraus ergab sich notwendigerweise eine Absenkung des RQ unter 1,0. Dehnt man die Versuche länger aus, so werden die Gärungsprodukte (nach RUHLAND und RAMSHORN 1938, Alkohol) verbraucht, und außerdem setzt das Wachstum immer stärker ein. Damit steigt der RQ auch wieder auf 1,0 und darüber an. Gegenüber der langen Kulturdauer von $4^1/_2$ Tagen mit erhöhtem RQ fallen natürlich die ersten Stunden mit niederem RQ nicht ins Gewicht, und so mußte sich für den Summenwert in der Arbeit von 1953 der höhere RQ ergeben. Gegenüber der in Luft gehaltenen Parallelprobe ergab sich auch 1953 für die unter O_2 gehaltenen Wurzeln ein deutlich niedrigerer RQ.

Einen RQ-Anstieg unter O_2 nach längerer Zeit hat auch BETZ (1957) beobachtet, aber im Gegensatz zu der oben vertretenen Anschauung nicht als Folge des einsetzenden Wachstums, sondern als Zeichen einer aeroben Gärung angesehen. Wie aber Gleichung 1 zeigt, ist für RQ-Werte um 1,1 die Annahme einer alkoholischen Gärung unnötig. Auch in allen anderen von uns durchgeführten Organkulturen, bei denen neben dem Gasstoffwechsel auch der N-Einbau gemessen wurde, ergab die Überschlagrechnung eine weitgehende Deckung der RQ-Erhöhung durch die Nitratreduktion. Eine eventuell vorhandene aerobe Gärung könnte also

nur sehr gering sein und unmöglich allein aus der manometrischen Messung erschlossen werden. Es muß zu deren Nachweis die quantitative Bestimmung des entstehenden Alkohols gefordert werden, wozu die grundlegende Arbeit von Ruhland und Ramshorn 1938 schon lange den Weg gewiesen hat.

Die durch die Betzsche Arbeit sehr viel mehr bestätigte als widerlegte Anschauung, daß die Gärung in den Meristemen nicht im strengen Sinne aerob, sondern nur durch Sauerstoffmangel bedingt ist, schließt nicht aus, daß zur normalen Entwicklung der Wurzeln eine alkoholische Gärung äußerst wichtig ist. Wie schon füher erwähnt (Kandler 1950), wachsen ja die Wurzelmeristeme tatsächlich immer unter suboptimaler Sauerstoffversorgung und werden daher stets, wenn auch nicht obligat, eine alkoholische Gärung aufweisen.

Literatur

Betz, A.: Zur Atmung wachsender Wurzelspitzen. III. Planta (Berl.) **50**, 122—143 (1957). — Kandler, O.: Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Atmungsstoffwechsel und Wachstumsvorgängen bei in vitro kultivierten Maiswurzeln. Z. Naturforsch. **5**, 203—211 (1950). — Über den „synthetischen Wirkungsgrad" in vitro kultivierter Embryonen, Sprosse und Wurzeln. Z. Naturforsch. **8**, 109—117 (1953). — Ruhland, W., u. K. Ramshorn: Aerobe Gärung in aktiven pflanzlichen Meristemen. Planta (Berl.) **28**, 471—514 (1938).

Dr. Otto Kandler,
Bakteriologisches Institut der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Freising-Weihenstephan

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (höchstens 1 Seite) anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch abgefaßt sein kann.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Neuere Ergebnisse aus Chemie und Stoffwechsel der Kohlenhydrate

8. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie am 2.—4. Mai 1957 in Mosbach/Baden. Mit 60 Textabbildungen. IV, 190 Seiten 8°. 1958.

Steif geheftet DM 29.80

Inhaltsübersicht: **Über die Stellung der Fructose im Intermediärstoffwechsel.** Von F. Leuthardt, Zürich (Schweiz). — **Pentosephosphate und Heptulosephosphat im Kohlenhydratstoffwechsel.** Von B. L. Horecker, Bethesda (USA). — **Versuche von A. J. Lehninger und Mitarbeitern über die Bildung von Ascorbinsäure.** Von K. Felix, Frankfurt a. M. — **Aerobe Gärung und Wachstum.** Von H. Holzer, Freiburg i. Br. — **Wechselbeziehungen zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel und ihre Störungen.** Von O. Wieland, München. — **Glycolipides des Bactéries, Plantes et Animaux inférieurs.** Par E. Lederer, Paris (France). — **Glykolipide der höheren Tierreihe.** Von K. Lauenstein, Köln. — **Phosphatkreislauf und Pasteur-Effekt.** Von F. Lynen, München. — **Bemerkungen zum Vortrag von Prof. Lynen.** Von B. Hess, Heidelberg. — Diskussionsbemerkungen zu den Referaten.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Protoplasmatologia

Handbuch der Protoplasmaforschung

Unter Mitwirkung hervorragender internationaler Fachleute herausgegeben
von
L. V. Heilbrunn und **F. Weber**
Philadelphia Graz
In 14 Bänden

Zuletzt erschienen:

Band II: Cytoplasma. C. Physik, Physikalische Chemie, Kolloidchemie
1. The Viscosity of Protoplasm

The Viscosity of Protoplasm

By **L. V. Heilbrunn**, Philadelphia
With 23 figures. IV, 109 pages Gr.-8°. 1958. DM 36.—; *Subskriptionspreis DM 27.—

Band II: Cytoplasma. C. Physik, Physikalische Chemie, Kolloidchemie
7. Osmotische Zustandsgrößen. a, b, c, d

Osmotischer Wert, Saugkraft, Turgor

Von **G. Blum**, Freiburg/Schweiz
Mit 12 Textabbildungen. IV, 102 Seiten

Plasmoptyse

Von **Ernst Küster †**, Gießen
Mit 10 Textabbildungen. 40 Seiten

Plasmorrhyse

Von **Hans H. Pfeiffer**, Bremen
Mit 8 Textabbildungen. 16 Seiten

Plasmoschise

Von **Hans H. Pfeiffer**, Bremen
Mit 1 Textabbildung. 7 Seiten Gr.-8°. 1958. DM 50.—; *Subskriptionspreis DM 40.—

Band VIII: Physiologie des Protoplasmas
9a. Polarität und inäquale Teilung der pflanzlichen Protoplasten

Polarität und inäquale Teilung des pflanzlichen Protoplasten

Von **E. Bünnig**, Tübingen
Mit 72 Textabbildungen. IV, 86 Seiten Gr.-8°. 1958. DM 33.—; *Subskriptionspreis DM 27.—

*Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches und für Abonnenten der Zeitschrift „Protoplasma"

SPRINGER-VERLAG / WIEN

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany